

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDES SUR L'IMMUNITÉ

PAR M. EL. METCHNIKOFF.

AVEC PLANCHES I ET II.

(2^e MÉMOIRE),

II. — LE CHARBON DES PIGEONS.

En poursuivant ces études¹, j'ai eu pour but de réunir un nombre aussi considérable que possible de faits capables d'éclairer la question de l'immunité contre les maladies infectieuses. La difficulté de ce genre de recherches m'a obligé à restreindre le champ de mes investigations, et à porter mon attention surtout sur le côté biologique de la question.

Partant de ce point de vue, j'ai choisi pour ma première étude le bacille du rouget des porcs, comme exemple d'un microbe qui se trouve d'une manière constante dans les cellules phagocytaires des animaux sensibles ou réfractaires. Cette étude m'a permis de répondre à une des objections principales émises contre la théorie des phagocytes² par MM. *Emmerich* et *di Mattei*,

1. Voir ces *Annales*, t. III, p. 289.

2. Après la publication de mon article, M. *E. Roux* a eu l'obligeance de vérifier encore une fois un des principaux résultats avancés par moi contre l'assertion de MM. *Emmerich* et *di Mattei*, sur la disparition rapide des bacilles du rouget dans le corps des lapins vaccinés. Après s'être assuré par une expérience de contrôle de

qui attribuent à une sécrétion antiseptique de l'organisme la prompte disparition des bacilles introduits sous la peau des lapins réfractaires.

Pour cette seconde étude, j'ai choisi, au contraire, un microbe, la bactériémie charbonneuse, qui ne se trouve qu'accidentellement dans les phagocytes, et qui, chez plusieurs espèces animales, se rencontre presque exclusivement en dehors de ces cellules. J'ai d'abord expérimenté sur le pigeon, parce qu'une des objections principales de l'école de M. *Baumgarten* contre la théorie des phagocytes, est fondée sur l'étude du charbon chez cet animal.

Mais, avant d'aborder ces objections, je dois récapituler brièvement les connaissances acquises sur le charbon des pigeons.

I

Quoique plusieurs expérimentateurs (*Oemler*, *Straus*, *Perroncito*, *Kitt*, *Czaplewski*, *Lubarsch*) aient réussi à donner le charbon aux pigeons, ils ont pu s'assurer toutefois que cette espèce est beaucoup moins sensible à la bactériémie qu'un grand nombre de mammifères et de petits oiseaux. Dans les expériences de M. *Kitt*¹, sur 17 pigeons inoculés, il n'en est mort que deux. Dans celles de M. *Czaplewski*², deux pigeons ont succombé sur onze. On peut donc considérer cet oiseau comme relativement réfractaire à la bactériémie, surtout lorsqu'il est adulte.

En recherchant la cause de cette immunité, M. *Hess*³ a constaté le fait que les bactériémies sont, pour la plupart, englobées et détruites par les leucocytes des pigeons, de la même manière que dans l'organisme d'autres animaux réfractaires au charbon. Une assertion diamétralement opposée a été avancée par M. *Baumgarten*⁴ et par son élève M. *Czaplewski* (l. c.). D'après ces auteurs,

l'état réfractaire d'un lapin vacciné, M. *Roux* lui a injecté quelques gouttes d'une culture de bacille du rouget. Le liquide, puisé au point d'inoculation, après cinq heures de séjour dans l'organisme du lapin réfractaire, contenait encore des bacilles vivants, ce qui fut prouvé à l'aide de cultures.

1. *Deutsche Zeitschrift f. Tiermedizin*, 1886, p. 92-98.

2. *Untersuchungen über die Immunität der Tauben gegen Milzbrand*. Diss. Inaug. Königsberg, 1889, réimprimé dans les *Beiträge z. pathologischen Anatomie* de Ziegler, t. VII, p. 47. Voir la critique de ce travail dans le n° 1 de ces *Annales*, 1890, p. 35.

3. *Archives de Virchow*, 1887, t. CIX, p. 379-380.

4. *Centralblatt f. klinische Medizin*, 1888, n° 29, p. 516.

es bactériidies injectées sous la peau des pigeons périssent spontanément au bout de quatre heures, sans une intervention quelconque des phagocytes. Ces cellules se montraient, dans les expériences du laboratoire de Königsberg, absolument incapables d'englober même les débris de bactériidies dégénérées, qui restaient libres dans le liquide de l'exsudat. Ce n'est que chez les pigeons morts charbonneux que M. *Czaplewski* a pu trouver des bactériidies intraleucocytaires à l'endroit de l'inoculation. M. *Lubarsch*¹ confirma ces résultats, car chez un pigeon qui s'est montré réfractaire au charbon, il ne réussit point à constater la phagocytose le lendemain de l'inoculation.

D'après ces données si défavorables à la théorie des phagocytes, on aurait pu croire que, justement chez le pigeon, le « rôle bactéricide » des humeurs devrait être très manifeste. Des expériences de M. *Nuttall*² il résulte cependant que le sang des pigeons est un milieu dans lequel la bactériдие commence à pousser déjà deux heures et demi après l'ensemencement.

Les recherches de M. *Oemler* et ses expériences personnelles ont porté M. *Kitt* à conclure que les bactériidies passées par l'organisme de pigeons s'atténuent sensiblement et acquièrent quelquefois les propriétés d'un second vaccin charbonneux. M. *Kitt* avoue, du reste, que ce résultat est loin d'être constant.

D'anciennes expériences du laboratoire de M. *Pasteur*, qui m'ont été communiquées verbalement par M. *E. Roux*, ont donné un résultat tout opposé. Elles ont prouvé que la bactériдие non seulement ne s'atténue pas par son passage à travers les pigeons, mais qu'au contraire elle se renforce d'une manière frappante et finit par tuer les poulets, animaux très réfractaires au charbon dans les conditions ordinaires.

II

Mes expériences ont confirmé, en général, les résultats obtenus par mes prédécesseurs en ce qui concerne la faible réceptivité des pigeons pour le charbon, comparativement à celle de plusieurs autres espèces animales, telles que souris, cobaye et lapin, employées dans les laboratoires. Mais, tandis que les

1. *Centralblatt für Bacteriologie*, 1889, t. VI, n° 48, 49, p. 486.

2. *Zeitschrift f. Hygiene*, t. IV, 1887 n. 378. Tab. VIII, n° 42.

pigeons supportent le plus souvent l'inoculation du virus charbonneux ordinaire, introduit sous la peau ou dans les muscles, ils succombent dans le plus grand nombre des cas après l'introduction du même virus dans la chambre antérieure de l'œil, ou encore après l'injection sous la peau ou dans les muscles du virus de passage à travers le pigeon.

Comme cela a été constaté par d'autres observateurs, la réceptivité des pigeons pour le charbon diminue avec l'âge; dans quelques cas, cependant, les jeunes individus résistent même aux inoculations du virus de passage. Ainsi, dans mes expériences, un pigeon jeune a résisté au virus du dixième passage, inoculé sous la peau, et un autre à celui du douzième passage, introduit dans le muscle pectoral.

L'influence des races n'a pas été suffisamment élucidée par mes expériences¹. J'ai bien vu que les pigeons à tarses nus et à tarses emplumés montraient en général la même réceptivité pour le charbon; mais les variations de détail ont pu m'échapper facilement.

En général, lorsque les pigeons avaient supporté la première inoculation, ils se montraient de beaucoup plus réfractaires aux inoculations suivantes. Je puis cependant noter une exception à cette règle, celle d'un pigeon, guéri après l'introduction du virus charbonneux sous la peau, et qui a succombé à la suite d'une seconde inoculation, d'un virus ordinaire, dans la chambre antérieure de l'œil.

Dans mes expériences, sur dix pigeons inoculés avec le virus ordinaire, cinq ont résisté et cinq ont succombé à l'infection charbonneuse; de 26 pigeons de passage, 3 seulement ont survécu et 23 sont morts charbonneux. On voit, d'après ces données, que la bactériémie qui a passé par l'organisme du pigeon, non seulement ne s'atténue pas, mais encore augmente de virulence pour les individus de la même espèce. En envisageant le tableau (appendice I), dans lequel est indiquée la durée du temps écoulé entre l'inoculation et la mort des pigeons, on verra que cette période, très variable en général, s'étend de 20 heures à 7 jours. Cette différence dépend, et de l'âge des pigeons ino-

1. Je me suis servi de pigeons vulgaires de races croisées, que les éleveurs désignent sous le nom de pigeons comestibles, et qui sont ceux que l'on trouve sur les marchés.

culés, et aussi de causes qui ne peuvent pas être précisées pour le moment.

En inoculant d'autres animaux sensibles au charbon, notamment des cobayes et des lapins, j'ai pu me convaincre que le virus charbonneux, après passage par une série de pigeons, se renforce aussi pour ces mammifères. Ainsi les cobayes adultes qui, inoculés avec du sang du cœur de pigeons de passage, mouraient d'abord en 36 et 57 heures, finirent par périr en 22 et 30 heures après l'inoculation avec le sang des pigeons du neuvième au douzième passage. (V. appendice II.) Chez les lapins, dont la réceptivité pour le charbon est en général moins grande, la diminution de la durée de la maladie n'est pas aussi marquée. Cependant, malgré le gros volume des lapins inoculés, aucun d'eux n'a résisté plus de 58 heures après l'introduction du virus de passage. Le résultat serait tout à fait différent si le virus se transformait dans l'organisme des pigeons en second vaccin, comme l'a affirmé M. Kitt.

Mes expériences confirment donc le résultat obtenu antérieurement dans le laboratoire de M. Pasteur sur le renforcement du virus de passage des pigeons.

Après ce que nous venons de dire sur la réceptivité relative des pigeons pour le charbon, on ne s'étonnera pas que les liquides de cet oiseau ne soient point un milieu impropre à la culture de la bactériodie. Nous avons déjà cité les expériences de M. Nuttall, qui a constaté que la bactériodie pousse dans le sang de pigeon, retiré de l'organisme. Dans mes recherches, je me suis servi de l'humeur aqueuse des pigeons réfractaires, que j'introduisais dans de petits tubes ou que je déposais sur des lamelles en gouttes pendantes. Ensemencé avec des spores de bactériodies, ce liquide donnait des cultures abondantes de filaments feutrés, parfaitement normaux et produisant un grand nombre de spores. J'ai obtenu le même résultat avec l'humeur aqueuse, retirée des yeux des pigeons réfractaires, qui avaient déjà subi une inoculation de charbon dans la chambre antérieure, inoculation suivie d'un hypopion. Quand les bactériodies avaient disparu, c'est-à-dire quatre ou cinq jours après l'introduction du virus charbonneux dans l'œil, je retirais quelques gouttes de l'exsudat, renfermant un nombre considérable de leucocytes. Cet exsudat, placé dans de petits tubes, ou disposé en gouttes pen-

dantes, était ensemencé soit avec de très petites quantités de sang charbonneux, soit (dans la majorité des cas) avec de tout petits morceaux de fil chargés de spores. Dans toutes ces expériences, les bactéridies poussaient régulièrement et donnaient parfois des cultures d'une abondance frappante. Les filaments étaient bien normaux et capables de produire beaucoup de spores.

J'ai obtenu le même résultat en ensemençant l'exsudat avec une trace d'une vieille culture du premier vaccin charbonneux. Le lendemain de l'ensemencement, toute la goutte était envahie par une culture abondante de filaments enchevêtrés, se colorant bien, et présentant sous tous les rapports les propriétés normales du premier vaccin.

Ces expériences prouvent donc que la bactéridie croît facilement dans la chambre antérieure de l'œil du pigeon, bien que cet animal soit peu sensible au charbon. J'ai déjà cité ce fait que l'inoculation dans l'œil des pigeons est beaucoup plus dangereuse que l'inoculation sous-cutanée.

Au lieu de retirer l'humeur aqueuse de l'œil des pigeons, et de faire la culture en dehors de l'organisme, introduisons des spores dans la chambre antérieure saine de pigeons réfractaires, dont l'immunité a été contrôlée, nous observerons régulièrement les phénomènes suivants. Au bout d'un certain nombre d'heures, les spores donnent des bactéridies normales en forme de bâtonnets qui s'allongent quelquefois en filaments. La chambre antérieure se trouble à la suite d'une immigration plus ou moins abondante de leucocytes, et les bactéridies finissent par disparaître après un temps variable selon les individus. Quelquefois, déjà le lendemain de l'inoculation, on constate la disparition du plus grand nombre des bactéridies; dans d'autres cas l'affection se prolonge davantage. L'inoculation du sang charbonneux dans la chambre antérieure de l'œil des pigeons réfractaires est suivie des mêmes phénomènes; dans un cas les bactéridies se sont conservées vivantes dans l'œil pendant six jours.

L'humeur aqueuse de l'œil des pigeons réfractaires peut servir également de milieu de culture au vaccin charbonneux. Ainsi, après avoir ensemencé dans un œil sain d'un pigeon, (qui avait déjà subi préalablement trois fois l'injection du virus fort), une petite goutte d'une ancienne culture de premier vaccin

charbonneux¹, j'ai pu constater le lendemain un développement abondant de filaments de ce vaccin, qui donnaient même des amas feutrés, avec tous les caractères des bactériidies atténuées normales (contours, facilité de se colorer, etc.).

Quelquefois on réussit même à observer le développement des bactériidies dans la chambre antérieure d'un œil qui a déjà subi une inoculation charbonneuse. Ainsi, dans une expérience, j'ai introduit un petit morceau d'un fil de soie chargé de spores dans la chambre antérieure d'un pigeon réfractaire, qui deux jours auparavant avait subi l'inoculation de spores de charbon dans le même œil. Avant d'introduire le fil, je me suis assuré que l'humeur de l'œil malade était légèrement trouble et contenait un nombre considérable de leucocytes, mais ne présentait pas du tout de bactériidies libres. Le lendemain de l'opération, j'ai pu constater, en examinant le fil retiré de l'œil, qu'un certain nombre de spores avait germé et donné des bactériidies composées de plusieurs (jusqu'à six) segments. Dans une autre expérience analogue, j'ai introduit le morceau de fil de soie, cinq jours après la première inoculation dans l'œil, alors que les bactériidies avaient déjà complètement disparu. Vingt-quatre heures après, j'ai pu observer des bactériidies nouvellement poussées et présentant jusqu'à sept segments. Ces bactériidies se coloraient en bleu foncé par le bleu de méthylène et paraissaient tout à fait normales. La même expérience, répétée sur le même œil un mois plus tard, a donné cette fois un résultat négatif.

Lorsqu'on inocule des pigeons sous la peau ou dans le muscle pectoral, et que ceux-ci ne succombent pas, on observe des résultats concordants avec ceux obtenus dans les expériences sur la chambre antérieure de l'œil. Dans plusieurs cas, l'introduction des bactériidies est suivie d'une affection accompagnée de la formation d'un œdème volumineux à l'endroit de l'inoculation; dans cet œdème, les bacilles se multiplient en grand nombre. La maladie dure quelquefois huit jours et plus, mais finit par se guérir en laissant à l'endroit inoculé un séquestre qui s'isole très lentement.

1. Dans la culture employée, il ne restait plus de bâtonnets ou de filaments d'apparence normale; elle était uniquement composée de formes d'involution et de spores.

Les inoculations subséquentes, pratiquées sous la peau des pigeons qui ont déjà supporté le virus charbonneux, ne donnent plus lieu à une affection sérieuse. Néanmoins les bactériidies, introduites à l'état de spores fixées sur des fils de soie, germent en plus ou moins grand nombre. Ce résultat a été constaté en introduisant sous la peau un morceau de fil enveloppé dans un peu d'ouate stérilisée, et à côté de lui un autre morceau du même fil non enveloppé. La précaution était d'ailleurs inutile, parce que les spores poussaient dans les deux morceaux, quoique dans celui qui était protégé par la ouate, le nombre des bacilles fût quelquefois plus considérable. Les bactériidies présentaient leur forme caractéristique, se coloraient pour la plupart en bleu foncé (par le bleu de méthylène), et présentaient l'aspect de bâtonnets ou de filaments comprenant jusqu'à vingt segments.

Comme dans la plupart des cas, il n'a pas été possible de prévoir avec une sûreté suffisante l'issue de l'infection; je me suis abstenu, dans mes recherches sur le sort des bactériidies introduites, de sacrifier les pigeons inoculés. Je les ai laissés vivre jusqu'à la mort occasionnée par le charbon, et j'ai conservé ceux qui résistaient; pour les examens, je prélevais de petites portions de l'exsudat, retiré de l'endroit inoculé.

Aussitôt après l'introduction des bactériidies sous la peau (j'ai surtout employé du sang de cobaye charbonneux), il se produit une réaction inflammatoire qui se manifeste par une immigration de leucocytes à l'endroit inoculé. Déjà quatre heures après le début de l'expérience, j'ai pu constater un afflux de leucocytes, dont un certain nombre contenait une ou plusieurs (jusqu'à neuf dans une cellule) bactériidies englobées. Les leucocytes qui présentaient ainsi des fonctions phagocytaires étaient des microphages, c'est-à-dire des globules blancs à noyau multiple et à protoplasme ne se colorant pas avec les couleurs d'aniline ordinaires. Sur des préparations colorées avec le bleu de méthylène, on pouvait distinguer nettement que les bactériidies englobées étaient pour la plupart colorées en bleu foncé, ainsi que la grande majorité des bacilles libres, répandus dans la goutte du liquide retiré du pigeon.

Avec le temps, la réaction leucocytaire s'accroît, et on trouve à l'endroit de l'inoculation un nombre plus grand de phagocytes. Outre les microphages, il apparaît des macrophages

(phagocytes mononucléaires avec un protoplasme se colorant par le bleu de méthylène), qui contiennent souvent plusieurs bactéridies colorées en bleu foncé.

Plus on s'éloigne du début de l'expérience, plus la différence s'accuse entre les phénomènes observés chez les pigeons réfractaires, et ceux qui se produisent chez les pigeons sensibles. Quelquefois vingt-quatre à quarante-huit heures après l'inoculation, on ne trouve plus que de rares bactéridies libres, tandis que le plus grand nombre est dans l'intérieur des phagocytes (macro- et microphages). Ces bactéridies englobées présentent alors toutes les phases de dégénérescence bien manifeste. La forme bacillaire se conserve longtemps, mais le contenu des bactéridies devient de plus en plus modifié et difficile à colorer ; tantôt les bacilles pâlisent uniformément (fig. 9, a, pl. I) tantôt ils deviennent granuleux (fig. 9, b ; fig. 11, a). — Ça et là on trouve aussi des bactéridies libres, qui présentent, les unes, l'aspect normal ; les autres, une apparence plus ou moins dégénérée. Dans plusieurs expériences, on a pu constater que ces dernières bactéridies avaient déjà passé par l'intérieur des cellules. Beaucoup de phagocytes, en effet, et surtout ceux d'entre eux qui contiennent le plus de bacilles, éclatent facilement et laissent échapper leur contenu, dans lequel se trouvent des bactéridies à tous les degrés de dégénérescence. Ce phénomène s'opère non seulement par suite de la préparation, mais sans doute aussi dans l'animal vivant, ce que prouvent les formes parfois dégénérées des noyaux des phagocytes remplis de bacilles. Dans une de mes expériences, en observant l'exsudat d'un pigeon, retiré trois jours après l'inoculation, j'ai été tellement frappé par le grand nombre de ces leucocytes éclatés et laissant échapper beaucoup de bactéridies, les unes d'apparence normale, les autres d'aspect dégénéré (fig. 8.), que j'inscrivis dans mon cahier de notes : « Plusieurs des macrophages paraissent complètement détruits et montrent des bactéridies faisant saillie à l'extérieur. Il est difficile de trouver un exemple plus caractéristique d'une lutte entre microbes et cellules. » Le lendemain, le pigeon a été trouvé mort, il avait tous les signes d'une affection charbonneuse intense.

En énonçant ces faits, je ne veux nullement affirmer que dans le corps du pigeon, toutes les bactéridies, sans exception,

qui ne se colorent pas facilement ou présentent d'autres signes de dégénérescence, proviennent nécessairement de l'intérieur des phagocytes. Dans chaque culture, même récente, et dans le corps des animaux les plus sensibles à l'action des microbes, on trouve quelques-uns de ceux-ci présentant tous les signes de mort, sans qu'on puisse l'attribuer à une influence phagocytaire quelconque. Il ne serait donc pas juste d'affirmer que les bactériidies dans l'organisme des pigeons ne périssent jamais autrement que sous l'action des phagocytes.

Chez tous les pigeons soumis à mon observation, les phagocytes des deux espèces apparaissaient régulièrement sur le champ de bataille, et englobaient les bacilles en plus ou moins grand nombre. Seulement, chez les pigeons qui se montraient les plus réfractaires à l'action des bactériidies ou qui guérissaient de l'affection, le plus grand nombre des bacilles se trouvait dans l'intérieur des phagocytes, tandis que chez les individus qui contractaient la maladie mortelle, la quantité des bactériidies intraphagocytaires était beaucoup moins considérable, et la majorité des microbes se trouvait en dehors des cellules. Cependant, dans ces cas, il se produisait dans le muscle inoculé, une phagocytose très prononcée : on pouvait facilement observer, sur le cadavre, un grand nombre de macrophages tout à fait remplis de granulations graisseuses (provenant des fibres musculaires dégénérées), mais ne contenant que rarement des bactériidies englobées.

Des phénomènes analogues suivent l'introduction des bactériidies dans la chambre antérieure de l'œil. Ici aussi, l'infection amène une réaction leucocytaire, accompagnée d'une phagocytose très prononcée. Les microphages et les macrophages pénètrent en grand nombre et s'emparent des bactériidies (fig. 1, 4) qui s'étaient auparavant multipliées et quelquefois allongées en filaments. Parfois, on parvient à observer des macrophages qui s'incorporent des microphages, contenant des bactériidies (fig. 4, a). Certains phagocytes se présentent remplis de bacilles réunis en amas (fig. 1, E, a); d'autres éclatent et laissent échapper les bactériidies qui se trouvent dans leur intérieur (fig. 1, F). Comme très caractéristiques, je dois mentionner des macrophages qui contiennent souvent un nombre considérable de bactériidies disposées plus ou moins parallèlement au

grand axe de la cellule; celle-ci présente alors un aspect fusiforme (fig. 6). Quelquefois, les bactériidies sont tellement nombreuses dans l'intérieur de ces macrophages que le noyau de ces derniers ne peut être distingué qu'avec beaucoup de difficulté. Alors, on serait tenté d'envisager ces cellules comme des amas de bactériidies, ce qui est arrivé à M. *Czaplewski*. Du reste, sur des préparations nettement colorées, rien de plus facile que de discerner la nature cellulaire de ces « amas » et de mettre en évidence la présence d'un noyau unique.

Après avoir observé la phagocytose chez les pigeons dans plus de quarante expériences sur le charbon, j'ai bien le droit de dire qu'elle est une règle générale, et de me ranger du côté de M. *Hess* et contre MM. *Czaplewski* et *Lubarsch*. Les résultats négatifs de ces auteurs indiquent surtout l'insuffisance de leurs observations, et tiennent pour une part peut-être aux méthodes défectueuses employées par eux ¹. Mais cela ne suffit pas cependant à expliquer l'échec de M. *Czaplewski*, puisque sa méthode a été capable de lui faire voir les bacilles englobés dans les leucocytes à l'endroit de l'inoculation chez deux pigeons morts charbonneux. Je suis en état de confirmer cette dernière assertion de mon adversaire. Mais je dois ajouter que des phagocytes contenant des bactériidies se trouvent non seulement près de l'endroit de l'inoculation chez les pigeons morts de charbon, mais aussi dans leurs organes internes. Contrairement à M. *Czaplewski*, qui n'a vu que des bacilles libres dans le foie de son pigeon, je puis affirmer que les phagocytes remplis de bactériidies abondaient dans le foie des pigeons morts du charbon et observés par moi. C'étaient non seulement des macrophages du foie, c'est-à-dire les cellules étoilées de M. *Kupffer*, qui renfermaient un grand nombre de bactériidies, mais encore de véritables cellules endothéliales des vaisseaux hépatiques. Dans la rate des mêmes pigeons, les bactériidies étaient également très nombreuses dans l'intérieur des cellules de la pulpe splé-

1. A ce propos, je dois noter qu'il est indispensable de modifier les méthodes afin d'obtenir des résultats satisfaisants. La méthode de coloration de *Gram*, excellente pour l'étude des bactériidies en général, est souvent insuffisante dans les recherches sur la phagocytose, parce qu'elle laisse, dans bien des cas, échapper précisément les bactériidies dégénérées dans l'intérieur des cellules. C'est alors que la simple coloration avec le bleu de méthylène donne de très bons résultats.

nique qui, comme on le sait, sont à un très haut degré douées de propriétés phagocytaires. Il va sans dire que dans les deux mêmes organes des pigeons morts charbonneux, il se trouvait toujours, à côté des bactériidies intracellulaires, un nombre considérable de ces bacilles parfaitement libres.

III

L'état vivant et virulent des bactériidies qui ont fini par tuer les pigeons n'étant pas contestable, je dois rechercher maintenant ce que deviennent les bacilles charbonneux, introduits dans l'organisme des pigeons guéris ou réfractaires. Afin d'obtenir une réponse précise, j'ai d'abordensemencé l'exsudat, retiré, à différentes périodes, de l'endroit de l'inoculation, dans la gélatine qui était ensuite étalée en plaque.

A l'aide de ce procédé, j'ai pu constater que le moment de la mort définitive des bactériidies introduites variait suivant les pigeons. Dans un cas, six jours après le début de l'expérience, j'ai obtenu des colonies isolées de bactériidies sur les plaques, mais c'est là le terme le plus long après lequel j'aie constaté la présence de bactériidies vivantes.

Le plus souvent elles périssaient dans un temps beaucoup plus court, mais en règle générale j'ai eu des cultures avec l'exsudat prélevé 24 heures après l'inoculation des pigeons.

Dans une autre série d'expériences sur les pigeons réfractaires, j'introduisais de petites quantités d'exsudat retiré de l'œil inoculé dans une goutte suspendue de bouillon que je transportais à l'étuve. Au bout de quelques heures, je pouvais déjà savoir si les bactériidies qui se trouvaient dans l'exsudat étaient vivantes ou non. Ici aussi il y avait des variations suivant les pigeons. Plusieurs fois j'ai observé la croissance des bactériidies dans des gouttes de bouillonensemencées avec l'exsudat extrait huit jours après l'inoculation dans l'œil de pigeons, dont l'immunité avait été contrôlée à plusieurs reprises.

J'ai obtenu des résultats analogues en laissant des gouttes d'exsudat à l'étuve, sans y ajouter ni bouillon, ni milieu nutritif quelconque. Comme exemple je citerai l'expérience suivante :

Le 13 décembre 1889, j'introduis dans l'œil sain d'un pigeon (qui a déjà supporté trois inoculations préalables de virus char-

bonneux) une goutte d'une ancienne culture du premier vaccin charbonneux, qui ne renfermait plus de bâtonnets normaux. Le lendemain, 20 heures après le début de l'expérience, dans une goutte d'exsudat retiré de l'œil malade, j'ai pu constater un nombre assez considérable de filaments du premier vaccin. Le plus grand nombre de ces bactériidies était libre, quelques-unes se trouvaient dans l'intérieur des phagocytes. Une goutte de cet exsudat, placée dans l'étuve à 31° C. (sans ajouter de bouillon) a donné le jour suivant beaucoup de filaments allongés et tout à faits normaux. Au contraire, dans l'exsudat extrait de l'œil inoculé 44 heures après le début de l'expérience, on voyait déjà un assez grand nombre de leucocytes immigrés; certains d'entre eux renfermaient des bactériidies pour la plupart dégénérées. Il ne se trouvait point de filaments libres dans l'exsudat.

Nous voyons donc que les bactériidies du premier vaccin, capables de germer dans l'organisme d'un pigeon complètement réfractaire au virus virulent, continuent à croître dans l'exsudat extrait de l'œil, tandis qu'elles deviennent la proie des phagocytes dans la chambre antérieure de cet œil même.

J'ai fait à plusieurs reprises l'épreuve de la virulence des bactériidies qui restaient dans l'organisme des pigeons réfractaires, et j'ai trouvé qu'elle se conserve pendant un temps assez long. Dans ce but, l'exsudat retiré de l'organisme était inoculé directement sous la peau des cobayes, ou le plus souvent il était préalablement mélangé avec une goutte de bouillon et laissé pendant quelques heures à l'étuve (à 30-33° C.). Cette précaution a été prise non seulement pour s'assurer de l'état vivant des bactériidies, mais encore pour augmenter le nombre de celles-ci, avant de les introduire dans l'organisme des lapins ou des cobayes. L'augmentation de virulence à la suite d'un séjour dans du bouillon n'était pas à craindre, car la règle générale est que la virulence tend, au contraire, à diminuer dans les cultures.

Citons quelques exemples. Dans l'œil droit d'un pigeon, qui a déjà résisté à quatre inoculations charbonneuses¹, on introduit un peu du sang d'un cobaye mort du charbon, et 22, 70, et 120 heures après, on puise des gouttes d'exsudat dans la chambre

1. Ce pigeon a déjà résisté à trois inoculations antérieures du charbon virulent sous la peau du thorax et d'une cuisse, et à une quatrième inoculation du même virus dans l'œil gauche.

antérieure. Les gouttes retirées sont mélangées avec un peu de bouillon et laissées pendant quelques heures à l'étuve à 30° C. Chaque goutte est inoculée à trois cobayes, qui meurent tous les trois avec tous les signes caractéristiques du charbon. La virulence s'est donc conservée pendant cinq jours de présence des bactériidies dans l'œil du pigeon réfractaire. Un terme un peu plus long a été constaté dans une autre expérience, où un cobaye contracta le charbon à la suite de l'inoculation d'une colonie poussée sur la gélatine après un séjour de six jours sous la peau d'un pigeon réfractaire. Dans une troisième expérience, un gros lapin mourut charbonneux après avoir été inoculé avec une goutte d'exsudat, retirée 22 heures après l'introduction de sang charbonneux dans l'œil d'un pigeon qui avait supporté quatre inoculations préalables¹. Dans cette même expérience, un cobaye reçut une goutte d'exsudat, retirée 26 heures après l'inoculation dans l'œil. Le nombre des bactériidies libres dans cet exsudat était déjà de beaucoup diminué, et les leucocytes contenaient des amas de bacilles englobés. Le cobaye, pesant 486 grammes, contracta le charbon et en mourut 60 heures après l'inoculation.

On voit donc, d'après ces exemples, que les bactériidies conservent pendant un ou plusieurs jours leur vitalité et leur virulence dans l'organisme des pigeons réfractaires. En ce qui concerne leur propriétés morphologiques, je dois noter ici qu'en général ces bactériidies présentent les variations et les particularités qui se retrouvent chez les animaux sensibles au charbon et notamment chez le lapin. Les bacilles, normaux pour la plupart,

1. L'histoire de ce pigeon est très intéressante. Inoculé pour la première fois avec le sang d'un cobaye charbonneux sous la peau du thorax, il a supporté ensuite deux inoculations du virus virulent sous la peau des cuisses et une troisième dans l'œil gauche. Une seconde inoculation dans le même œil n'a même pas donné de germination des spores introduites. Considéré comme complètement réfractaire, le pigeon a été réinoculé dans l'autre œil resté sain avec une petite goutte de sang d'un cobaye charbonneux. Il se forma comme d'habitude une exsudation dans la chambre antérieure, dans laquelle les bacilles diminuèrent progressivement et finirent par disparaître. Quinze jours après la dernière inoculation, le pigeon mourut en état de cachexie très avancée. Dans l'œil inoculé se trouvaient des bactériidies tantôt normales, tantôt en formes d'involution. Sur des préparations de sang, du poumon, de la rate (pâle et petite), et d'un rein, je n'ai pas trouvé de bactériidies; j'en ai vu fort peu sur une préparation prise sur l'autre rein. L'ensemencement du foie n'a pas donné de culture, mais celui du sang du cœur et du rein s'est montré fécond.

se colorent facilement avec les couleurs d'aniline ; mais on rencontre aussi sur des préparations colorées des bactériidies plus ou moins pâles, plus ou moins larges, etc. Dans plus de cinquante expériences exécutées sur des pigeons, je n'ai rencontré que deux fois des formes d'involution. La première fois je les ai observées sous forme de spirales dans l'œil d'un pigeon qui mourut avec beaucoup de bactériidies dans le sang et les organes. Une autre fois j'ai rencontré des filaments renflés en forme de massue dans l'exsudat retiré cinq jours après la dernière inoculation du virus dans l'œil du pigeon, dont l'histoire a été rapportée dans la note de la page précédente. Dans une goutte de bouillon, ces filaments sont retournés à leur état normal et ont donné de longs filaments.

IV

Abordons maintenant la question de l'état sous lequel les bactériidies sont englobées par les phagocytes. Comme je l'ai indiqué plus haut, la phagocytose chez les pigeons s'observe dès les premières heures après l'introduction du virus charbonneux, ce qui porte à conclure que les leucocytes englobent les bacilles vivants. Cette question de la vitalité des bactériidies intraphagocytaires a soulevé beaucoup d'objections, et tout récemment encore M. *Flügge*¹ a formulé en thèse générale que les phagocytes ne sont capables d'englober que les microbes déjà morts auparavant. Il est vrai que plusieurs observateurs, comme MM. *Petruschky*² et *Lubarsch*³, soutiennent l'opinion contraire. Le premier de ces auteurs admet, conformément à l'assertion de M. *Koch*, que les bactériidies englobées par les leucocytes des grenouilles se développent dans l'intérieur de ces cellules en filaments spiraux. Cette opinion est basée, non sur des observations directes, mais sur des déductions *a priori*. Dans le courant de mes recherches multipliées sur la phagocytose chez les grenouilles, je n'ai observé que des faits contraires à l'assertion de M. *Petruschky* sur la croissance des bactériidies dans les leucocytes vivants. M. *Lubarsch* admet, avec beaucoup plus de raison, le fait de l'englobement des bactéries vivantes, en se basant sur la différence

1. *Grundriss der Hygiene*, 1889, p. 487.

2. *Zeitschrift für Hygiene*, t. VII, 1889, p. 78.

3. *Centralblatt für Bacteriologie*, t. VI, 1889, numéros 18, 49.

avec laquelle les microbes introduits vivants dans l'organisme des grenouilles et des raies sont englobés, par comparaison avec les mêmes microbes tués préalablement.

Dès mes premières recherches sur la phagocytose, j'ai tâché de résoudre la question qui nous préoccupe. Ainsi je suis parvenu à constater la mobilité, signe de vie, des bactéries englobées par les phagocytes, chez les ascidies, les bipinnaria et les grenouilles¹. Plus tard, j'ai trouvé dans la coloration avec une vieille solution de vésuvine une méthode pour distinguer les bacilles morts des vivants, et j'ai pu prouver ainsi que les bactériidies sont englobées à l'état vivant². L'étude de la phagocytose des pigeons nous donne le moyen le plus direct pour nous assurer de ce fait. Dans ce but, on retire une petite goutte d'exsudat contenant des bactériidies englobées, on la mélange avec une goutte de bouillon, et on expose la goutte pendante ainsi préparée à l'action d'une température convenable. Le bouillon tue les phagocytes et laisse pousser les bactériidies. En fixant sous le microscope des cellules renfermant des bacilles, on peut suivre facilement la marche du développement de ces derniers. A l'aide de cette méthode aussi simple que démonstrative, j'ai réussi à constater dans cinq pigeons (dont trois ont succombé au charbon), le fait que les phagocytes, les macrophages, aussi bien que les microphages, englobent les bactériidies à l'état vivant. La planche II représente ce fait. Les figures 12 et 13 montrent un seul et même microphage à un intervalle d'une heure, pendant laquelle deux bactériidies englobées *a* et *b* ont visiblement poussé dans le bouillon; un troisième bacille (*c*), qui dès le début présentait une réfringence plus considérable ne s'est pas allongé du tout, ce qui prouve qu'il était mort. Les figures 14 et 15 ont été prises d'après un autre macrophage du même pigeon, et font voir un état plus avancé du développement d'une bactériдие englobée. Le stade de la figure 15 a été observé 45 minutes après celui de la figure 14. — A côté des phagocytes qui contiennent des bactériidies vivantes, on en voit bien d'autres qui ne renferment que des bacilles morts. Comme exemple, je puis citer la cellule des figures 16 et 17, qui contient un bacille dont les dimensions n'ont

1. V. *Arbeiten des zool. Instit. zu Wien*, V, 1, 1883, p. 160, et *Biologisches Centralblatt*, 1883, p. 562.

2. Ces *Annales*, 1887, p. 325, et *Archives de Virchow*, 1888, t. CXIX., p. 469, 482.

point changé pendant le cours de l'expérience. Souvent, au contraire, les phagocytes englobent plusieurs bactériidies qui, toutes, s'allongent dans le bouillon. Ainsi le macrophage des fig. 18, 19, 20 a été trouvé avec trois bacilles englobés, dont un (*b, c*), le plus grand, s'est plié en forme d'anse. Pendant que le phagocyte, fixé sur le champ du microscope, était observé, les deux branches du grand bacille *b* et *c* se sont divisées (fig. 19) et chacune a continué son développement ultérieur (fig. 20). En même temps, deux autres bactériidies englobées se sont allongées de manière à ne laisser aucun doute.

La preuve que les microphages sont aussi en état d'englober les bactériidies vivantes est fournie par la cellule des fig. 21, 23, qui représentent un microphage, des deux bouts duquel est sorti un long bacille en forme de filament. La partie *a* s'est détachée sous mes yeux au cours de l'observation. L'objection que la cellule dans ce cas a été percée par un filament libre en état de croissance ne pourrait point être formulée, parce qu'en observant le développement des bactériidies dans des gouttes pendantes, on voit toujours que le filament écarte les cellules qu'il rencontre, et ne les perfore jamais.

La constatation des faits énoncés est en général chose facile, néanmoins on ne doit pas compter toujours réussir du premier coup ; des recherches prolongées sont indispensables, et il est certain qu'il est plus facile encore d'obtenir un résultat négatif, c'est-à-dire de ne pas voir le développement des bactériidies englobées.

En poursuivant l'étude en gouttes pendantes de l'exsudat mélangé avec du bouillon, on est obligé de reconnaître que la grande majorité des bactériidies libres est toujours vivante, tandis que le plus grand nombre des bacilles morts se trouve dans l'intérieur des phagocytes. De ce fait, constaté à plusieurs reprises, on peut déjà déduire que les phagocytes sont en état de tuer les bactériidies, englobées à l'état vivant.

V

Afin de résoudre la question de savoir si les phagocytes sont capables d'englober des bactériidies non seulement vivantes, mais en même temps virulentes, j'ai entrepris une série d'expériences,

dans laquelle je fis l'inoculation de cultures issues des bactériidies intraphagocytaires. Dans ce but, j'ai retiré une goutte d'exsudat, 22 heures après l'introduction de sang charbonneux dans l'œil d'un pigeon qui avait déjà survécu à quatre inoculations préalables. Après un séjour de trois heures dans l'étuve à 30°, la goutte pendante d'exsudat, mélangée avec une goutte de bouillon, démontra que des bactériidies contenues dans un certain nombre de phagocytes commençait déjà à pousser. Trois de ces phagocytes ont été isolés et transportés dans trois gouttes de bouillon, à l'aide de mon collaborateur M. *Havkine*¹. En les observant d'heure en heure, je pouvais suivre le développement ultérieur des bactériidies englobées, et m'assurer qu'elles étaient réellement seules dans les gouttes pendantes. Une de ces bactériidies, que nous désignerons par la lettre A, est représentée sur la fig. 24, (pl. II). Elle a été englobée par un microphage à noyau double, et a poussé à l'une des extrémités. La situation intracellulaire du bacille a été mise hors de doute : en effet, en transportant la cellule dans de nouvelles gouttes de bouillon, sa position a été maintes fois changée, sans que la situation du bacille vis-à-vis de la cellule ait été modifiée, ce qui prouve que celui-ci n'était pas accolé au phagocyte, mais logé dans son intérieur. Au bout de huit heures, la bactériдие A donna dans la goutte pendante une petite culture, composée de filaments enchevêtrés, qui fut alors transportée dans un ballon contenant du bouillon, de veau. Le lendemain matin, il s'était développé une culture pure assez abondante, composée de bâtonnets courts qui troublaient le bouillon et se déposaient au fond du ballon. Avec cette culture j'ai inoculé une souris blanche, un jeune cobaye et deux lapins adultes. La souris mourut 20 heures et le cobaye 24 heures après l'inoculation. Un lapin mourut en quatre jours et l'autre en moins de trois jours. Les quatre animaux présentaient les signes caractéristiques du charbon (bactériidies dans le sang et les organes, hypertrophie de la rate, œdèmes cutanés chez les lapins et le cobaye).

1. Cet isolement d'un phagocyte renfermant une bactériдие est délicat à réaliser. On y parvient avec beaucoup de patience, et en se servant de tubes de verre très fins que l'on peut observer sous le microscope. Cette méthode est employée par les zoologistes pour isoler les infusoires sous le microscope ; dans ces expériences méticuleuses, j'ai été aidé avec beaucoup d'habileté par M. *Havkine*.

Un autre microphage isolé, que nous désignons par la lettre B, a été trouvé avec deux bactériidies englobées qui commençaient à s'allonger (fig. 25); ce microphage fut transporté dans une goutte pendante de bouillon, et les deux bactériidies ont continué leur développement, restant toujours liées au phagocyte qui les avait englobées, (fig. 26); de l'une des bactériidies se détacha un bacille (fig. 26, *a*), qui a été enlevé pour ne laisser que les deux bactériidies liées à la cellule. Leur croissance progressive a été poursuivie pendant plusieurs heures de suite (fig. 27, 28, 29), ce qui permet de s'assurer complètement de l'absence de toute autre bactériдие dans la goutte pendante. Au bout de huit heures, il se forma une seule petite colonie, qui fut transportée dans un ballon de bouillon. Le lendemain, la culture présentait le même aspect que celle du bacille A et fut inoculée à un jeune cobaye, à un cobaye et à deux lapins adultes. Le jeune cobaye mourut 24 heures, le cobaye adulte 35 heures et demie, un lapin 82 heures après l'inoculation. Ces trois animaux présentaient des œdèmes sous-cutanés, des rates caractéristiques, et des bactériidies en grand nombre. Le second lapin mourut 93 heures après l'inoculation, à la suite d'une septicémie accidentelle.

Un troisième phagocyte a été isolé : il contenait une bactériдие qui, en croissant, est sortie par les deux bouts de la cellule. Cette cellule que nous désignerons par C, ressemblait avec son bacille à celle représentée sur la fig. 21. Il a été procédé avec elle comme avec les deux autres. La culture obtenue a été inoculée à deux cobayes et à deux lapins adultes. Le premier cobaye mourut 34, le second 93 heures, le premier lapin 101 heures après l'inoculation; tous trois étaient charbonneux. Le second lapin a survécu à l'inoculation; la survie de cet animal n'indiquait pas une diminution de virulence, car le virus d'origine, qui a tué un cobaye (celui dont le sang a servi à l'inoculation du pigeon), en 36 heures et un lapin en trois jours, n'a pas été capable de donner le charbon à un autre lapin. Dans tous les cas la mortalité des animaux, inoculés avec les cultures, provenant de A et B, prouvent suffisamment qu'au moins dans ces cas, les bactériidies englobées n'étaient point atténuées. Comme le virus charbonneux se renforce dans l'organisme des pigeons et que même chez les pigeons morts du charbon le

nombre des bactériidies intraphagocytaires est très considérable, on pourrait considérer ce renforcement des bactériidies, comme une réaction contre l'influence des phagocytes. Le fait du renforcement des bactériidies dans les pigeons prouve toutefois que ce milieu est loin d'être défavorable à la production des toxines charbonneuses et est contraire à l'hypothèse que les phagocytes ne rencontreraient dans le corps de ces oiseaux que des bactériidies inaptes à sécréter leur poison.

On voit donc, d'après ce qui précède : 1° que l'immunité des pigeons pour le charbon n'est que relative ; 2° que les bactériidies sont loin d'être inaptes à vivre et à se multiplier dans l'organisme et dans les humeurs des pigeons ; 3° que le nombre des bactériidies extra-cellulaires mortes est de beaucoup moindre que celui des bactériidies intraphagocytaires mortes ; 4° que les phagocytes des deux espèces sont capables d'englober les bactériidies vivantes et virulentes ; 5° enfin que le virus charbonneux se renforce dans l'organisme des pigeons.

En envisageant ces résultats dans leur ensemble, on voit bien le rôle important des phagocytes dans la lutte de l'organisme des pigeons contre l'invasion des bactériidies.

On m'a souvent attribué la pensée qu'en mettant en évidence le phagocytisme, je niais tout autre influence servant à débarrasser l'organisme des microbes envahisseurs. Je me suis toujours défendu contre cette assertion, et je répète encore une fois que le rôle des phagocytes est très important dans les maladies infectieuses en général et dans le charbon des pigeons en particulier, mais que cela ne prouve nullement qu'on ne trouvera pas un jour, aidant l'action des phagocytes, une autre influence qui échappe encore à nos investigations.

Ces recherches sur le charbon des pigeons ont été entreprises sous l'impression des objections faites surtout par M. *Czaplewski*. On voit bien, d'après ce qui a été rapporté dans ce mémoire, que ces objections ne peuvent plus être soutenues dans leurs points essentiels, ce qui nous permet de ne pas nous arrêter à leur critique détaillée.

EXPLICATION DES FIGURES.

Les contours de toutes les figures ont été pris à l'aide d'une chambre claire de *Nachet*.

PLANCHE I

Fig. 1. Préparation de l'exsudat retiré 24 heures après l'injection d'une goutte de sang charbonneux dans l'œil d'un pigeon réfractaire. — Coloration par le bleu de méthylène (solution aqueuse). Grossissement : oculaire 3, système 1/18 de Zeiss.

A. Une bactériodie libre. — B. Un macrophage dépourvu de bactériodies mais contenant trois grains de pigment. — C. Un leucocyte rempli de bactériodies. — D. Un macrophage contenant plusieurs bacilles englobés. — E. Un leucocyte renfermant tout un amas de bactériodies, *a*. — F. Un microphage éclaté, laissant échapper les bacilles. — G. Un bacille libre entouré de sa gaine. — H. Deux bactériodies dégénérées et accolées l'une à l'autre.

Fig. 2. Préparation d'exsudat de l'œil du même pigeon, après un séjour de quelques heures dans une goutte de bouillon et à l'étuve. Même coloration et même grossissement que Fig. 1.

A. Une bactériodie allongée à côté d'un leucocyte renfermant un bacille mort. — B. Un autre leucocyte altéré et contenant deux bacilles morts. — C. Une bactériodie allongée. — D. Une bactériodie qui a poussé de l'intérieur d'un microphage.

Fig. 3. Macrophages d'une préparation du muscle inoculé d'un pigeon mort du charbon. Coloration par le picrocarmin et le violet de gentiane d'après Gram. Grossissement Ocul. 3, syst. 1/18. — A. Un macrophage rempli de bacilles foncés. — B. Un autre contenant des bactériodies pâles.

Fig. 4. Phagocytes contenant des bactériodies, dans l'exsudat de l'œil d'un pigeon réfractaire, 49 heures après l'inoculation. Coloration Gram, avec picrocarmin. Ocul. 3, syst. 1/18. — A. Un macrophage avec un microphage et un bacille englobés. — *n*. Noyau du macrophage. — *a*. Noyau du microphage. En dessous du macrophage, un microphage rempli de bacilles, — 4 B. Un macrophage avec huit bactériodies englobées. — *a*. bacilles pâles. — 4 C. Un microphage contenant deux bacilles.

Fig. 5. Préparation de l'exsudat de l'œil du pigeon du onzième passage retiré 27 heures après l'inoculation. Coloration comme dans les Fig. 3 et 4. Ocul. 3, syst. 1/18. — 5 A. Microphage avec trois bacilles, dont deux pâles *a*. — 5 B. Un autre microphage contenant un seul bacille. — 5 C. Microphage avec un bacille foncé et un autre pâle *a*. — 5 D, 5 E. Bactériodies libres.

Fig. 6. Macrophage de l'exsudat de l'œil d'un pigeon réfractaire, coloration avec le bleu de méthylène. Ocul. 3, syst. 1/18.

Fig. 7. Un macrophage d'un autre pigeon. Exsudat de l'œil, retiré 72 heures après l'inoculation. — *a*. Bacilles morts. Bleu de méthylène. Oc. 3, 1/18.

Fig. 8. Un macrophage éclaté d'un pigeon. Exsudat de l'œil 3 jours après l'inoculation. — *n*. Noyau du macrophage. — *a*. Bacilles dégénérés. Bleu de méth. 3 + 1/18.

Fig. 9. Macrophage d'un pigeon réfractaire 46 heures après l'inoculation. Exsudat sous-cutané. — *a, b*. Bacilles dégénérés.

Fig. 10, 11. Deux microphages du même pigeon. — *a*. Bacilles dégénérés, Bleu de méth. 3 + 1/18.

PLANCHE II.

Toutes les figures sont dessinées d'après le vivant.

Fig. 12. Un macrophage de l'exsudat de l'œil d'un pigeon, retiré trois jours après l'inoculation, et mélangé avec du bouillon. — *a, b, c*. Trois bactériidies englobées. Grossissement : Oculaire 4, système F de Zeiss.

Fig. 13. Le même macrophage, une heure plus tard. Même grossissement.

Fig. 14. Un autre macrophage de même origine. Même grossissement.

Fig. 15. Le même phagocyte trois quarts d'heure plus tard. Même grossissement.

Fig. 16. Un phagocyte contenant un bacille mort. Exsudat de l'œil d'un pigeon retiré cinq jours après l'inoculation, mélangé avec du bouillon et mis à l'étuve à 30° C. Ocul. 2, syst. 1/18 Zeiss.

Fig. 17. Le même phagocyte, vingt minutes plus tard. Même grossissement.

Fig. 18. Un macrophage du même pigeon. Grossissement Ocul. 4, syst. D.

Fig. 19. Le même macrophage cinq minutes plus tard. — *a, b, c* bactériidies englobées. Oculaire 2, syst. 1/18.

Fig. 20. Le même phagocyte vingt minutes plus tard. Même grossissement.

Fig. 21. Un microphage du même pigeon avec une bactériдие en filament. — *a*, portion qui s'est détachée pendant le cours de l'observation. Grossissement oculaire 3, système D.

Fig. 22. Le même microphage, quinze minutes tard. Même grossissement.

Fig. 23. Le même encore quinze minutes plus tard. Même grossissement.

Fig. 24. Un microphage avec la bactériдие A. Exsudat de l'œil d'un pigeon qui a supporté quatre inoculations précédentes : grossissement oculaire 3, syst. F.

Fig. 25. Un autre phagocyte (B) de même origine.

Fig. 26. Le même phagocyte avec ses deux bactériidies, une heure plus tard. — *a*. Bacille détaché.

Fig. 27. Le même phagocyte, 50 minutes après.

Fig. 28 Le même, 55 minutes après le stade de la fig. 27.

Fig. 29. Le même, une heure et quart plus tard :

Les Fig. 25-29 ont été prises avec un grossissement ocul. 5, syst. D.

APPENDICE N° 1.

Tableau d'une série de pigeons de passage.

N° des passages.	Temps écoulé entre l'inoculation et la mort.	Survie.
1	4 jours.	—
2	4 jours.	—
3	3 jours.	—
4	40 heures.	—
5	moins de 3 jours.	—
6	44 heures.	—
7	44 heures.	—
8*	44 heures.	—
9	46 heures.	—
10	presque 7 jours.	—
10	moins de 3 jours.	—
10	—	+
11	moins de 45 heures.	—
12	50 heures.	—
12**	—	+
13	6 jours et demi.	—
13	4 jours.	—
14	3 journées et demie.	—
15	3 journées et demie.	—
16	moins de 44 heures.	—
<hr/>		
Total : 20 pigeons.	18 morts.	2 survivants.

APPENDICE N° II.

Tableau des cobayes inoculés avec le sang du cœur des pigeons de passage.

N° des passages des pigeons.	Temps écoulé entre l'inoculation et la mort.	Poids du cadavre en grammes.
1	48 heures	
1	40 heures.	
6	31 heures.	487
7	40 heures.	444
9	28 heures 20'	362
10	22 heures 20'	422
11	29 heures 40'	532

* Ce pigeon a été inoculé avec le sang d'un cobaye mort après avoir reçu le sang du pigeon du 7^m passage.

** Ce pigeon a été inoculé avec le sang d'un lapin mort après avoir été inoculé avec le sang du pigeon du 11^m passage.

NOUVELLES RECHERCHES SUR LE MICROBE PYOCYANIQUE

PAR M. C. GESSARD

Pharmacien major, professeur agrégé au Val-de-Grâce.

TRAVAIL DU LABORATOIRE DE CHIMIE BIOLOGIQUE DE L'INSTITUT PASTEUR.

Les milieux de culture habituellement employés n'ont pas donné, pour la production de la pyocyanine par son microbe, d'aussi bons résultats que le milieu dont je me suis servi pour cet objet¹. Qu'il me soit permis de rappeler que du transport d'un fragment de pansement bleu dans la salive et d'une série d'ensemencements successifs dans le même liquide, j'obtins des cultures identiques, dans leur coloration d'un bleu pur, aux belles parties des linges colorés, ou mieux, à la solution du principe même qui les colore, la pyocyanine, qu'on savait en extraire. Cette identité était d'autant plus nécessaire à constater qu'on était moins préparé alors à accepter, dans les caractères de cultures d'un même microbe, des variations parfois considérables en relation avec des variations le plus souvent minimales dans les influences en jeu. Que ces idées, qui entrent peu à peu dans la science, n'aient pas encore pénétré dans tous les esprits, c'est ce que prouve l'histoire même du microbe pyocyanique, dans les travaux récents auxquels il a donné lieu : elles n'ont sûrement pas inspiré cette récente distinction d'un bacille pyocyanique α et d'un bacille ϵ , surtout par les signes différentiels qu'on leur attribue. C'est ainsi que la liquéfaction plus prompte de la gélatine en plaque ; la forme de cette liquéfaction (en verre à champagne) à partir de la strie d'inoculation dans les tubes et

1. De la pyocyanine et de son microbe. Thèse de Paris, 1882.

sa rapidité plus grande à s'étendre aux parois du tube, à gagner en profondeur; un retard d'un jour dans l'apparition de la couleur, retard compensé par un ton plus bleu du vert; une teinte moins fluorescente, mais résistant mieux à la lumière du gaz; sur la gélose, l'aspect d'un ruban plat, sec, plissé en travers, cannelé, au lieu d'une surface proéminente, humide, brillante et lisse; sur pomme de terre, le phénomène-caméléon si caractéristique (*Chamäleon-phänomen durchaus charakteristisch*) du verdissement au contact de l'air, qui n'est du reste que ce qui avait été constaté anciennement dans le bouillon et qui se reproduit par l'agitation de ce dernier; enfin une activité plus grande dans les mouvements du bacille, reconnue au microscope, sont, pour M. Ernst, des titres à constituer une variété ϵ avec l'organisme retiré des pansements bleus à la clinique chirurgicale de Heidelberg¹, en face de l'organisme des laboratoires de Berlin et de Breslau qui devient le bacille α . Sans doute, les données chimiques ont été un peu trop négligées, et M. Frick² a le droit de dire qu'on a attribué au bacille α celles qu'a fournies la matière colorante du bacille ϵ . Que si l'on en tient compte, en effet, on arrive à cette conclusion que l'on n'obtient pas de pyocyanine des cultures du bacille α , et avec M. Ledderhose³ on élève à la dignité d'espèce, sous le nom de *Bacillus pyofluorescens*, ce bacille pyocyanique (*Bac-pyocyanus* α) qui ne fait pas de pyocyanine. Quelle importance ont ces faits et jusqu'à quel point peuvent-ils servir de base à la création d'une espèce ou seulement d'une variété? C'est ce que permettra de décider peut-être le présent travail.

Wasserrug⁴ concluait de ses essais en milieux divers que « la coloration franchement bleue de la pyocyanine n'apparaît pas dans les milieux ordinaires où l'on fait vivre le bacille... ces cultures sont colorées en un vert plus ou moins foncé ». D'autres auteurs parlent encore d'une fluorescence marquée de la couleur verte.

1. P. ERNST. Sur un nouveau bacille du pus bleu (*Bac. pyocyanus* β), variété du *Bac. pyocyan.* des auteurs. *Zeitschrift f. Hygiene*. Bd. II, 1887.

2. A. FRICK. Études bactériologiques sur le crachat vert et sur les bacilles produisant une couleur verte. *Virchow's Archiv*. Bd. CXVI, 1889.

3. Sur le pus bleu. *Deutsche Zeitschrift für Chirurgie*. Bd. XXVIII, 1888.

4. Sur la formation de la matière colorante chez le *Bacillus pyocyanus*. Ces *Annales*, T. I, 1887, p. 581.

I.

Un grand nombre des faits qui relèvent de la biologie microbienne ont un caractère de contingence dont ne sont pas exempts même les attributs en apparence les plus essentiels des microbes, ceux qu'à raison d'une constance relative on a adoptés pour la diagnose des espèces. Des modifications fréquentes se présentent dans l'aspect des cultures, la forme, les produits de sécrétion, la fonction; et pour la fonction, c'est en certains cas sa suppression même qui peut en résulter. On est donc amené à concevoir dans les microorganismes la vie indépendante de la fonction; on peut se proposer leur dissociation; on la réalise par des artifices de culture. Cette notion (et le bacille pyocyanique avec les travaux de MM. Charrin, Guignard¹, Roger² et Wassergug³, a contribué à l'affermir dans la science) doit présider à toute recherche bactériologique. Elle aide à comprendre ici que le milieu qui paraît le plus favorable au développement du bacille ne fournisse pas le meilleur rendement en pyocyanine. C'est le cas du bouillon de bœuf ou de veau à 1 partie de viande pour 2 parties d'eau, sans qu'une concentration plus grande (viande et eau, parties égales) ni l'addition de peptone améliorent sensiblement les résultats.

Le microbe y pullule vite en effet. Fréquemment il forme un voile à la surface; bientôt le fond du matras est tapissé d'un dépôt abondant d'organismes. La viscosité de la culture, qui la rend filante comme du pus traité par l'ammoniaque, survient de même rapidement. Cependant la couleur est verte, comme il a été dit plus haut. Il faut se garder d'exagérer la part qui revient dans cet aspect au mélange de la couleur jaune du bouillon avec le bleu de la pyocyanine. C'est, d'ailleurs, un vert brillant, fluorescent, précédant même parfois de quelques heures, en faible quantité, mais sans confusion possible, l'apparition du pigment bleu; et, dans l'extraction de la pyocyanine au moyen du chlo-

1. Sur les variations morphologiques des microbes. Comptes rendus. Ac. des sciences. T. CV, 1887.

2. Des modifications qu'on peut provoquer dans les fonctions d'un microbe chromogène. Comptes rendus. Soc. de Biologie, 1887.

3. L. C.

roforme, la couche chloroformique d'un bleu pur est surnagée par la liqueur aqueuse restée d'un beau vert fluorescent. D'autre part, la technique éprouvée pour l'isolement des espèces à l'état de pureté ne permet pas de songer à un mélange avec la bactérie dont j'ai signalé la présence possible dans le pus, et qui est un bacille fluorescent. Il reste dès lors, comme interprétation valable, qu'à côté du pigment bleu le microbe ait donné naissance dans la culture à une autre matière colorante. Cette conclusion, pour recevoir la sanction de l'expérience, impliquerait l'existence d'un milieu où le bacille, comme dans la salive de mes premières recherches, produisit la pyocyanine à l'exclusion du pigment étranger. La vraisemblance d'un meilleur rendement en pyocyanine dans ces conditions était faite pour encourager les recherches. La présence de l'azote dans la molécule de la pyocyanine, facile à vérifier par l'essai classique à la chaux sodée, devait les diriger du côté des milieux azotés.

J'ai trouvé ainsi que dans une solution de peptone, peptone du commerce neutre ou faiblement alcaline, à 2 0/0, le bacille se développe sans produire de matière verte fluorescente. La culture a une belle teinte bleue, dont la production est hâtée par l'addition à ce liquide de 5 0/0 de glycérine.

Une élégante contre-épreuve résulte de l'ensemencement du bacille dans l'albumine, telle qu'on peut l'extraire de l'œuf avec pureté, ou additionnée seulement de glycérine, dont l'effet se traduit, dans ce cas aussi, par une rapidité plus grande dans l'apparition du pigment. Ici, c'est la matière fluorescente verte qui prend *seule* naissance, comme l'aspect, ainsi que l'essai au chloroforme en témoignent. Ce résultat a été constant dans neuf ensemencements en série, au terme desquels le microbe n'avait pas perdu la faculté de reproduire les effets connus dans les milieux précités : une goutte de la neuvième culture donnait la coloration bleue dans la solution de peptone, et dans le bouillon, le mélange habituel de pyocyanine et de pigment fluorescent.

On devait alors présumer que le produit de transformation de l'albumine, c'est-à-dire l'albumine-peptone, qui est à l'albumine ce qu'est la peptone vis-à-vis de la fibrine du muscle, donnerait les mêmes résultats que la fibrine-peptone. Pour m'en assurer, d'un blanc d'œuf dilué de trois fois son poids d'eau, j'ai fait deux parts. L'une a étéensemencée sans autre traitement ; l'autre,

additionnée en proportions voulues d'acide chlorhydrique et de pepsine, a été mise à digérer à l'étuve, jusqu'à ce que le ferrocyanure de potassium acétique, n'y formant plus de précipité, indiquât la fin de la peptonisation. La liqueur neutralisée par la potasse, puis ensemencée avec la même culture et à la même dose que la première, a pris une coloration bleue sans mélange, tandis que la portion qui n'avait pas subi ce traitement présentait une fluorescence magnifique sans trace de bleu.

Beaucoup d'auteurs font consister la peptonisation dans une hydratation de la matière albuminoïde. Nous retrouverions donc ici le fait général, dont on connaît les applications dans les phénomènes de la digestion, dans l'inégale aptitude à la fermentation d'un saccharose et d'un glucose, etc., je veux dire la distinction établie par les cellules entre les principes immédiats et leurs produits d'hydratation; la réaction cellulaire est différente selon le cas, mais elle est rendue ici sensible à la vue par la persistance, à travers les variations de milieu, d'une fonction chromogène dans le bacille.

Le jeu brillant de couleurs qui en résulte peut être mis en évidence d'une façon très simple, sans l'embarras d'avoir à faire une peptonisation. L'action des diastases peut être remplacée par des actions chimiques et physiques. On peut ainsi se contenter du traitement à chaud de l'albumine par l'acide chlorhydrique, ou d'une digestion à l'autoclave à 120°, ou, plus simplement encore, de l'ébullition dans l'eau pour transformer l'albumine, non en totalité, mais de façon à rendre possible l'apparition de pyocyanine, à côté de ce qui persiste de fluorescence verte.

Le microbe de la pyocyanine vit bien aussi dans une solution de gélatine à 10 0/0, à l'étuve à 35°; son activité y est encore accrue par l'addition de glycérine. Il y donne de la pyocyanine, en moindre quantité peut-être, mais sans accompagnement de fluorescence verte. La réaction biologique s'accorde dans ce cas avec le plus grand nombre des réactions chimiques pour rapprocher la gélatine de la peptone. Les organismes supérieurs établissent, au contraire, comme on sait, une grande différence entre l'une et l'autre.

Il n'est pas moins intéressant de constater la sensibilité du microbe à la matière albuminoïde et la façon dont il traduit sa présence, tant qu'il en reste des traces : cette production de

pigment vert fluorescent dont il l'accompagne, jusqu'à sa conversion complète en peptone. Dans ses transformations successives, sous les états intermédiaires (comme en offre le bouillon), que la chimie, avec des réactions de précipitation, fixe et revêt parfois d'individualités distinctes, la réaction biologique révèle l'unité de substance, conformément aux conclusions qu'a tirées M. Duclaux de son étude critique et expérimentale sur les matières albuminoïdes du lait.

On peut résumer ainsi les effets des divers milieux alimentaires fournis au microbe :

Albumine donne fluorescence verte sans pyocyanine ;

Peptone, gélatine donnent pyocyanine sans fluorescence verte ;

Bouillon donne à la fois fluorescence verte et pyocyanine.

Ce dernier milieu est ainsi intermédiaire entre les deux premiers, comme sa constitution chimique, participant de l'un et de l'autre, pouvait le faire supposer.

Le lait offre les effets du bouillon, mais par un enchaînement différent de circonstances. Il n'y a pas de peptone préexistante. C'est d'abord la fluorescence verte qui s'y manifeste. Mais le bacille agit par une diastase sur la caséine pour la peptoniser et se procurer ainsi l'élément de production de la pyocyanine.

II

L'étude chimique du pigment vert fluorescent reste tout entière à faire. On n'en connaît que la disparition par les acides, la réapparition ou l'exagération de la fluorescence par les alcalis, ce qui établit une analogie avec la fluorescence de l'esculine, de la fluoescéine. Il n'y a pas lieu d'insister autant que font les auteurs allemands sur le caractère qu'elle offre de s'éteindre à la lumière du gaz, caractère commun à toutes les substances fluorescentes dans une lumière faible et surtout pauvre en rayons ultra-violet. Il n'en faut retenir que le moyen, dans les premiers temps d'une culture, de distinguer si la faible teinte verte du début, dans les divers liquides, appartient au pigment fluorescent, auquel cas l'éclairage artificiel n'en laisse rien subsister, ou à des traces de pyocyanine, qui résiste à cette épreuve.

La réaction aux acides et aux alcalis cependant est celle même que présente la couleur verte des cultures de *bacillus fluorescens liquefaciens* et de *bac. fluorescens putridus*. Il faut sans doute des titres plus nombreux pour conclure à l'identité du pigment dans ces différentes espèces, identité qui me paraît pourtant très vraisemblable. Du moins, un nouveau caractère commun vient ajouter à cette vraisemblance. Comme le bacille pyocyanique, le *bac. fluorescens liquefaciens*, le *bac. fluorescens putridus*, qui offrent en milieu albumineux, dans le bouillon, le plus vif éclat, en sont dépouillés dans la solution de peptone, sans production corrélative, comme pour le premier bacille, d'une coloration nouvelle, bien que la culture se peuple abondamment. Voilà donc deux organismes chez lesquels ce caractère de fluorescence a paru constant, au point de passer dans leur diagnose spécifique : il ne tient pourtant pas devant un nouveau milieu, et un milieu qu'on ne peut certes pas regarder comme trop défavorable, ni assimiler aux milieux additionnés d'antiseptiques, qu'on fait servir d'ordinaire à la suppression de la fonction chromogène, car il fournit encore aux frais de la sécrétion de pyocyanine par l'autre espèce.

Il semble bien aussi que ce pigment vert fluorescent soit un caractère commun à un bien plus grand nombre d'espèces, tout en restant toujours dans une dépendance étroite du milieu. M. Frick ¹ l'attribue à six espèces dans son mémoire sur les bacilles qui produisent la coloration verte des crachats ; c'est d'ailleurs toujours à l'occasion du même milieu qu'il est constaté, liquide ou solide, à base de bouillon.

M. H. Scholl ² en a doté le bacille du lait bleu, cultivé aussi sur gélatine au bouillon ³.

De ces espèces même, il se peut que quelques-unes aient passé entre mes mains. J'ai multiplié, en effet, les essais et les

1. *Loco citato*.

2. Contributions à la connaissance des décompositions du lait par les microorganismes. Sur le lait bleu. *Fortschr. d. Med.* 1889, n° 21.

3. Je rapprocherai, sous les réserves que commande l'ignorance de la nature de ces pigments, la substance fluorescente que M. R. Dubois a signalée dans le sang vert des pyrophores et qui aurait les mêmes réactions : « L'acide acétique en détruit la fluorescence, l'ammoniaque la fait reparaitre... elle en exagère notablement l'éclat. » *Les Élatérides lumineuses* : p. 217-248. Thèse de la faculté des sciences, 1886.

expériences pour vérifier cette influence du milieu, et, en recueillant des échantillons de toutes parts, je m'enquerais moins de la nature de l'espèce que de son aptitude éprouvée à produire ce brillant aspect fluorescent. J'ai trouvé chaque fois que la fluorescence existait dans le bouillon, mais qu'elle disparaissait dans le milieu à la peptone, où le microbe ne se développait pas moins cependant, avec un peu de retard peut-être, mais aboutissait aussi bien, sur la peptone gélatinisée, à liquéfier le milieu, s'il avait la propriété de liquéfier aussi le bouillon gélatinisé, toujours expérimenté en parallèle.

D'une expérience unique, il résulterait que le *microbacillus prodigiosus*, au contraire du *pyocyanus*, ne se contente pas de la solution de peptone pour déployer sa fonction chromogène.

III

Si la cause reconnue de la coloration bleue des pansements a retiré bien de l'intérêt au fait lui-même, on ne saurait toutefois s'en désintéresser complètement, ni méconnaître l'utilité qu'il peut y avoir à confronter avec les circonstances où il apparaît spontanément, celles dont les recherches expérimentales semblent impliquer la nécessité. L'observation attentive des premières, en révélant le déterminisme exact du phénomène, doit conduire à serrer plus que nous n'avons fait jusqu'ici, ces conditions de sa production naturelle, pour en attendre aussi un meilleur succès. Les milieux de culture solides en fournissent les moyens. On a toujours noté, en effet, que la coloration bleue apparaît sur les pièces de pansement plutôt que dans la partie liquide à la surface des plaies : ce fut la première raison de nier la suppuration bleue. Nous pouvons, utilisant la substance qui a déjà donné de si bons résultats, essayer des cultures sur la peptone glycinée, solidifiée à la gélose. L'effet en est très rapide et très beau ; la masse est en quelques jours d'un bleu magnifique dans toute son étendue.

A la vérité, la présence de peptones dans le pus est constante, et l'on aurait peut-être droit d'attribuer aux propriétés osmotiques de cet élément, aptes à le faire parvenir jusqu'aux parties extérieures des pansements, au moins autant qu'aux propriétés aérobies du microorganisme, le siège d'ordinaire superficiel de la

coloration bleue. Le pus toutefois est surtout fait de principes plus rapprochés de l'albumine, de quelque nom qu'on les désigne, sérine, globuline ou pyine. Or l'albumine d'œuf qui, à l'état liquide, n'entretient, comme on a vu, que la production du pigment vert fluorescent, a constitué après solidification par la gélose un milieu propice au développement simultané de ce pigment et de la pyocyanine. Voudrait-on faire intervenir la gélose dans ce phénomène pour une action autre qu'une modification physique du milieu, il n'est pas prouvé davantage que la matière première des linges n'y participe en quelque façon, dans la coloration des pansements.

L'intérêt d'une production plus abondante de pyocyanine sur milieu solide serait fort réduit dans la pratique si les difficultés d'extraction étaient accrues par ce procédé même. Ce n'est heureusement pas le cas. Le chloroforme, maintenu sur la culture colorée, se charge de pyocyanine, sans qu'il soit besoin d'agiter, par un contact de quelques heures, soit du jour au lendemain. 10^{cc} épuisent à peu près une couche d'un centimètre d'épaisseur dans un matras Pasteur. Et, s'il est besoin d'une dose nouvelle pour achever l'épuisement, c'est un liquide qui, n'étant pas saturé, peut servir au premier traitement d'un nouveau matras dans un lavage méthodique.

On doit insister quelque peu sur cette précieuse propriété de la gélose de former comme une éponge véritable qui s'imprègne des produits versés à sa surface et les cède avec la plus grande facilité à un dissolvant approprié. On pourra même employer l'eau dans certains cas, et renouveler plusieurs fois le traitement sans amener la désagrégation de la masse. J'ai pu aussi, après une première culture de bacille pyocyanique et un lavage au chloroforme, restituer sa richesse alimentaire au substratum solide, par addition de la dose voulue de peptone sous le moindre volume de solution, assurer l'amalgame du tout et la stérilisation dans un traitement à l'autoclave, et réussir une seconde culture dans ce milieu ainsi rajeuni.

On est peut-être autorisé à entrevoir dans ces faits le germe d'une méthode nouvelle pour obtenir certains produits des microbes vivant bien sur milieux solides, dans des conditions assurément meilleures qu'on ne les obtiendrait des milieux liquides. Outre qu'il dispenserait d'agitations, de concentrations,

qui multiplient et prolongent le contact avec l'air de matières altérables, un tel procédé aurait l'avantage de livrer à l'action des dissolvants ces produits, sous cet état de division dans une masse solide où l'on est accoutumé d'amener les corps pour favoriser l'extraction des principes immédiats.

IV

Le traitement chloroformique donne lieu encore à des observations intéressantes.

Le substratum solide, dépouillé de la pyocyanine, ne reste jamais incolore, pas plus dans le cas où la gélose est à base de peptone que dans le cas où, après l'avoir rendue nutritive par du bouillon, nous y voyons reparaître, comme on pouvait s'y attendre d'après l'expérience de ce milieu à l'état liquide, la coloration due au pigment fluorescent insoluble dans le chloroforme.

La gélose à la peptone reste rougeâtre. Cependant le chloroforme ne laisse pas, avec une culture en peptone liquide de même âge, une teinte comparable dans la couche aqueuse surnageante, et on ne retrouve pas ici le parallélisme d'effets qui s'offre avec le bouillon sous les deux états; mais cette couche aqueuse présente une coloration verdâtre. C'est au moins ce qu'on observe, si l'on s'adresse à des cultures récentes, ou si l'on note la coloration peu de temps après que les deux couches dans le tube à expérience se sont reformées par le repos. Mais si les cultures comparées sont plus anciennes, la même couleur rougeâtre se retrouve aussi dans la couche aqueuse du milieu liquide épuisé; et même, pour la culture jeune, elle peut apparaître si on examine cette couche après vingt-quatre heures d'exposition à l'air. Ces apparences sont liées à l'existence, dans les cultures sur peptone aussi, d'un autre pigment, d'assez faible teinte, mais éminemment colorable par oxydation.

Dans le bouillon, une altération de même ordre fait succéder une teinte brune au vert fluorescent des premiers temps. Mais le pigment, associé à la pyocyanine dans la solution de peptone, se transformerait plus vite. Pour le milieu solide, tout au moins, si rapide que soit l'extraction de pyocyanine, même dès les

vingt-quatre premières heures, délai où le pigment en milieu liquide s'est conservé verdâtre, la gélose reste rosée, après le traitement au chloroforme.

Pour l'un et l'autre aliment d'ailleurs, le phénomène de transformation peut être suivi même dans les cultures liquides, sans qu'il soit besoin de séparer la pyocyanine qui se détruit du reste simultanément; il aboutit aussi à un degré d'altération plus avancé, à une coloration toujours plus foncée que dans les cultures solides. Le vieillissement (on serait tenté de dire la maturation, tant ces faits offrent de ressemblance avec les transformations que l'âge amène dans les organes colorés des végétaux) est marqué à la vue, pour le bouillon, par la teinte brune qui coexiste d'abord avec du vert fluorescent échappé à cette altération et l'assombrit, puis le réduit toujours davantage, et s'y substitue définitivement pour aboutir à la couleur feuille-morte des vieilles cultures d'où la pyocyanine a disparu. Ce brunissement croissant ne s'observe pas moins bien avec les cultures en albumine, et dans les tubes à expérience où s'est faite l'extraction de la pyocyanine, sur la partie aqueuse qui surnage le chloroforme. C'est, en réalité, un effet indépendant du microbe même, sinon de la nature des produits qu'il rejette, lesquels peuvent, en accroissant l'alcalinité du milieu, accélérer l'action oxydante de l'air. Je m'en suis assuré en séparant l'organisme par la filtration sur porcelaine, ou le détruisant par la chaleur, ou suspendant son développement par l'essence de moutarde. Les changements de teinte ne s'en produisent pas moins dans le sens habituel. D'autre part, une couche d'huile ou d'essence de térébenthine à la surface des liquides agit en retardant cette oxydation.

Dans la solution de peptone, c'est la teinte rougeâtre qui, s'ajoutant au bleu, donne du violet, et prédomine finalement en rouge lie-de-vin, par suite de la destruction complète de la pyocyanine. Il faut signaler entre ces termes extrêmes une teinte intermédiaire, indécise, d'un aspect gris, à peine gris de lin, aussi peu colorée que possible, d'où l'agitation avec le chloroforme fait sortir les deux couleurs franches, rouge et bleu; phénomène bien frappant, d'apparence paradoxale, dont le jeu des couleurs complémentaires donne aisément la clef.

Et ainsi, par ce pigment nouveau, est fournie l'explication

de cette teinte de début toujours verte, de ce ton vert qu'offrait encore le bleu, bien amélioré pourtant, dans les cultures en peptone glycérinée.

Cette explication était surtout sollicitée par l'aspect des cultures en gélatine, pour lesquelles, l'argument commode d'un mélange de jaune apporté par l'aliment ne pouvait plus être invoqué. C'est, en effet, un beau vert d'eau que manifeste la gélatine si complètement incolore au début, avec passage plus rapide au rouge, et aboutissant en dernier terme à un rouge plus intense aussi, d'une franche couleur de vin.

Cette gélatine va nous fournir de plus le moyen d'isoler ce pigment nouveau, comme l'albumine permettait d'obtenir le vert fluorescent à l'exclusion de la pyocyanine. Il suffit de l'additionner de 1 pour 100 de glucose. On obtient alors une couleur verte, vert jaunâtre, dont le chloroforme n'extrait pas trace de pyocyanine et qui passe au brun rouge avec le temps.

On peut, ajoutant au tableau donné plus haut, résumer ces divers résultats dans les propositions suivantes :

Albumine d'œuf donne pigment vert fluorescent qui passe au brun avec le temps;

Bouillon donne pigment vert fluorescent et pyocyanine;

Peptone ou gélatine donne pyocyanine et pigment vert jaunâtre;

Gélatine à 1 0/0 de glucose donne pigment vert jaunâtre qui passe au brun rouge avec le temps¹.

Ainsi la pyocyanine ne se trouve jamais seule dans les milieux les plus favorables à sa production. Doit-on voir un rapport nécessaire entre son apparition et celle de ces pigments qui l'accompagnent? Ou la présence de ceux-ci est-elle de pure concomitance, et liée simplement à la proportion, qui entre dans nos milieux organiques complexes, de l'élément dans la dépendance duquel ils nous ont apparu, matière albuminoïde pour le pigment vert fluorescent, hydrate de carbone pour le pigment vert jaunâtre? La dernière interprétation donnerait l'espoir de

1. M. le Dr Babès (*Comptes rendus de la Société de biologie*, 1889, p. 438), paraît avoir rencontré quelques-uns de ces pigments, bien que la description qu'il en donne soit assez confuse. Mais il ne paraît pas avoir porté son attention sur ce qui forme le point principal de mon travail, la relation du pigment avec la nature du milieu nutritif.

trouver les conditions de production exclusive de pyocyanine dans une étroite proportion entre l'azote et la matière hydrocarbonée, proportion qui se trouvait rompue au profit du premier dans l'albumine, de la dernière dans la gélatine glucosée et dans la peptone et la gélatine glycérinées. C'est à de nouvelles expériences qu'il appartient d'élucider cette question, et, s'il est possible, de réaliser ce milieu.

Il suffit, pour l'instant, que le milieu nouveau dont nous disposons, peptone glycérinée à l'état solide ou liquide, facilite la production et augmente le rendement en pyocyanine dans des proportions qui permettent désormais l'étude de cette curieuse substance.

V

Quelques considérations encore doivent achever de justifier pleinement la préférence maintenue à la peptone, même après qu'il a été démontré que la pyocyanine n'y est pas plus exempte que dans le bouillon de mélange avec un pigment étranger.

Même à rendement égal, la supériorité de la peptone pourrait être facilement défendue. Le bouillon, en effet, devient rapidement visqueux, ce qui, en favorisant l'émulsion, constitue une grave difficulté pour l'extraction chloroformique. Son alcalinité croît parallèlement, devient même assez forte dans les vieilles cultures; c'est une condition d'altération de la pyocyanine, qui y est plus rapidement détruite, sans que je puisse dire par suite de quelles transformations, ni si la triméthylamine, dont l'odeur succède au parfum aromatique des cultures jeunes, est un produit de sa décomposition. Enfin si, pour le rendre plus nourrissant, on prépare le bouillon avec parties égales de viande et d'eau, ou si on l'additionne de peptone, c'est au bénéfice du pigment vert fluorescent, de la gélatinisation plus prompte à survenir, que semblent s'exercer ces modifications.

Pour la peptone, au contraire, les rendements croissent proportionnellement aux titres pondéraux des solutions employées; les liqueurs chloroformiques les mesurent en une véritable échelle colorimétrique. J'ai employé la solution de peptone au dixième, et la séparation des deux liquides s'est faite toujours

aussi nette et aussi rapide, après agitation avec le chloroforme, sans trace d'émulsion. La culture ne devient pas alcaline en vieillissant, a plutôt une réaction acide au papier bleu. La pyocyanine, quoique finissant aussi par disparaître, met un temps plus long à se détruire entièrement. De toutes façons, l'extraction en peut être comprise dans des limites de temps moins resserrées que pour le bouillon.

Dans l'un et l'autre milieu, la glycérine exerce, outre une influence marquée sur le temps d'apparition et sur la quantité de la pyocyanine, une action préservatrice pour la maintenir plus longtemps intacte en présence des causes d'altération habituelles.

VI

La doctrine moderne qui voit dans la virulence une résultante, d'ordre physiologique, d'actions d'ordre chimique qui dépendent à la fois de la nature du microbe et de la composition du milieu, peut revendiquer quelques-uns des faits exposés dans ce travail.

Nous venons de voir une légère modification dans la constitution chimique d'un milieu, ou, moins encore, une simple variation dans son état physique, modifier profondément la fonction chromogène du bacille pyocyanique. Des influences aussi délicates dans l'être vivant qu'un microbe virulent a envahi, doivent intervenir pour accroître ou diminuer l'action pathogène, ou même pour l'annihiler entièrement et réaliser l'immunité, sans entamer la spécificité du microbe qui reparaitra, comme le fait la fonction pyocyanique, dans un milieu mieux approprié. De même, nous avons vu que la réaction pigmentaire en milieu albumineux ne permettait pas de distinguer le bacille pyocyanique d'un certain nombre d'espèces très différentes. On peut, il me semble, rapprocher ce fait de ces cas pathologiques où la spécificité de la maladie reste douteuse, lorsque, par exemple, l'invasion du microbe s'accompagne d'un cortège banal de symptômes, de phénomènes communs à d'autres maladies microbiennes.

En somme, variabilité des symptômes pour un même microbe, identité des symptômes pour des microbes divers, telle est la traduction physiologique des faits mentionnés dans ce travail.

En raison de la part importante qui revient dans les effets

observés aux moindres changements dans les conditions expérimentales, ce doit être une règle pour toute étude bactériologique de relater exactement les circonstances où elle s'est effectuée. Je me conformerai à cette règle.

Le bouillon et la solution de peptone n'offrent aucune particularité à signaler : le premier, à 1 partie de viande de veau pour 2 parties d'eau; la peptone, telle que la procure le commerce, a la réaction convenable, sans addition d'alcali.

Le blanc d'œuf, extrait dans les conditions de pureté voulues, ne doit entraîner aucune trace de jaune, ce dernier déterminant la production de pyocyanine. Pour la solidification, on mélangeait avec une gelée de gélose faite à l'eau distillée, à la température de 35°, dans des conditions qui excluent toute modification de l'albumine par la chaleur.

La gélatine était rapidement dissoute, au titre de 10 0/0, dans l'eau, à feu nu; puis, la température descendue au-dessous de 50°, mélangée d'un blanc d'œuf battu, 25 grammes environ pour 800 grammes de solution. On portait à l'autoclave à 120°, et retirait le feu sitôt ce point atteint. Le magma, laissé à refroidir dans l'appareil, était en état d'attendre sans altération le moment de la filtration. On y procédait dans la vapeur d'eau, à l'autoclave. Elle est ainsi très rapide et donne un produit très clair. La répartition faite dans les vases de culture, on stérilisait en une fois, à 120°, pendant 5 minutes. Il n'était pas question d'utiliser la gélatine comme milieu solide; encore n'a-t-elle pas perdu par ce traitement les qualités qui la font rechercher pour cet emploi.

On supprimait pour la gélose l'opération pénible de la filtration; il s'agissait de l'apparition de couleurs, toujours faciles à voir, et non de l'analyse minutieuse de caractères de culture. Elle était employée à une dose supérieure à celle que l'eau peut dissoudre, soit 0^{gr},5 pour 10^{cc} de liquide, volume constant dans tous les essais, et directement introduite dans chaque récipient.

On employait des matras Pasteur ou les petits matras coniques, dits d'Erlenmeyer, même pour les milieux solides.

La semence était empruntée aux cultures en bouillon, sauf pour les cultures en série qui ont réussi avec les différents milieux.

SUR L'EXALTATION DE LA VIRULENCE DU BACILLE MORVEUX,

PAR M. N. GAMALÉIA.

I

Plusieurs fois déjà, ¹ on a montré que les formes cliniques des maladies infectieuses, loin d'être fixes et immuables pour chaque microbe spécifique, présentent, au contraire, certaines variations, qui dépendent de la résistance animale et de la virulence de ce microbe.

Dans ces variations des formes morbides, la virulence exaltée des microbes produit exactement le même résultat que la diminution de la résistance animale, et l'augmentation de la résistance animale (par ex. par la vaccination) a les mêmes effets que l'atténuation de la virulence.

Ainsi, j'ai trouvé que le *streptococcus lanceolatus Pasteuri*, (pneumocoque de Talamon-Fränkel-Weichselbaum), atténué, produit chez le lapin la même lésion locale que celle qu'il amène lorsqu'il est virulent, chez le lapin vacciné ou chez le chien, naturellement réfractaire ².

J'ai obtenu depuis la même marche des phénomènes dans le charbon, le choléra et la maladie causée par le *Vibrio Metchnikovi* ³.

Quant au sens général des modifications, apportées par l'exaltation de la virulence des microbes ou par la diminution de la résistance animale, je l'ai défini sous le nom de *généralisation septicémique*, car en devenant plus virulents, les microbes nommés se sont faits plus envahissants, sont devenus capables de

1. V. l'Histoire dans Bouchard, *Comptes rendus*, 4 nov. 1889.

2. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1888. pp. 440 et s.

3. Ces *Annales*, 1888 et 1889.

pulluler dans le sang, tandis que les microbes atténués ne produisent qu'une lésion qui reste localisée.

Les expériences suivantes prouvent que le bacille morveux se conforme aussi aux propositions générales que je viens de formuler.

II

1^{re} SÉRIE. 1. Le 18 septembre 1887 un spermophile¹ est inoculé sous la peau par un demi-cent. cube d'une émulsion faite avec une culture de morve sur gélose glycinée. Il meurt le 23 en présentant les lésions habituelles de la morve : nodules disséminés dans la rate, le foie et les poumons. Quelques rares bacilles morveux sont trouvés au microscope et par la culture dans le sang de son cœur. L'émulsion de son foie sert à l'inoculation d'un second spermophile (3^{cc}).

2. Celui-ci meurt le 27 septembre. La rate est hyperémiee et remplie de tubercules. Le sang du cœur contient des bacilles plus nombreux. L'émulsion du foie est inoculée à un troisième spermophile (1/2^{cc}).

3. Celui-ci meurt le 30. La rate est *sans tubercules*, qui ne se retrouvent pas non plus dans aucun autre organe. Bacilles morveux nombreux dans le sang du cœur, dans la rate et le foie. L'émulsion de celui-ci est inoculée (1^{cc}) à un lapin sous la peau du front. Ce lapin tombe malade le 3 octobre : dyspnée, larmolement, écoulement puriforme du nez. Il meurt le 6 octobre. Rate énorme, remplie de tubercules, qui sont nombreux aussi dans le foie, les poumons, les *glandes séminales* et les cavités nasales. Les bacilles morveux, nombreux dans les tubercules, ne se trouvaient pas dans le sang du cœur.

2^e SÉRIE. 1. Le 13 septembre, un spermophile est inoculé sous la peau par 1^{cc} d'une culture de morve sur gélose.

Le 19 septembre, il meurt avec les lésions habituelles de la morve tuberculeuse. L'émulsion de son foie est inoculée (1/2 c. c.) à un autre spermophile.

2. Celui-ci meurt le 24. Tumeur indurée à l'endroit de l'inoculation. Rate tuberculeuse. L'émulsion du foie est inoculée à un spermophile neuf (1/2^{cc}).

3. Il meurt le 29. Abscès à l'endroit de l'injection ; rate tuberculeuse ; toujours peu de bacilles dans le sang du cœur. Un nouveau spermophile est inoculé par l'émulsion du foie (1/2^{cc}).

4. Il meurt le 1^{er} octobre. Rate hyperémiee *non tuberculeuse*. Les bacilles se voient au microscope dans le sang du cœur. Celui-ci est inoculé à un jeune lapin (2^{cc}).

5. Il meurt le 3 octobre. Rate hyperémiee. Dans le sang du cœur et dans

1. C'est M. D. Kranzfeld qui a montré que les spermophiles sont très aptes à contracter la morve (*Centralblatt. f. Bact.* 1887.)

tous les organes se trouvent des bacilles morveux. Le sang du cœur (2^{cc}) est inoculé sous la peau d'un petit lapin neuf.

6. Celui-ci succombe le 5. Rate hyperémiee. Tous les organes et le sang du cœur contiennent des bacilles morveux. L'émulsion du sang (2^{cc}) est inoculée à un lapin adulte

7. Il meurt le 7 octobre. La rate et le foie sont remplis de tubercules. Les bacilles morveux se trouvent dans tous les organes, ainsi que dans le sang du cœur.

III

On voit, par conséquent, que le bacille de la morve, qui est en général peu virulent pour le lapin (à moins qu'il ne soit introduit en quantités considérables par les veines-*Löffler*), est exalté par ses passages à travers le spermophile au point de pouvoir tuer les lapins par l'injection sous-cutanée.

On voit, aussi, que ce bacille exalté détermine chez le spermophile (et même parfois chez le lapin) non plus une affection à tumeurs inflammatoires (tubercules), mais une septicémie, caractérisée par l'hyperémie de la rate et de nombreux bacilles dans le sang du cœur.

On peut concevoir une transformation inverse. En effet, j'ai observé chez les spermophiles, succombant au premier vaccin charbonneux, vis-à-vis duquel ils sont très résistants, la formation de cellules géantes, ce qui est très intéressant pour une maladie aussi nettement septicémique que le charbon.

Quoi qu'il en soit, il est acquis que le bacille morveux se comporte de la même manière que les quatre microbes dont l'histoire a été racontée précédemment, et que son exaltation se traduit aussi par une généralisation septicémique.

P.-S. Qu'il me soit permis ici, bien que le sujet soit différent, de répondre au travail publié récemment par M. Pfeiffer sur le *vibrio Metchnikovi* et ses relations avec le choléra asiatique. (On en trouvera une analyse plus loin, p. 424.)

En 1888, j'ai décrit dans ces Annales une maladie des poules qui ressemblait au choléra humain, par la diarrhée et la localisation exclusivement intestinale du microbe pathogène. Ce microbe lui-même ressemblait au vibron cholérique par sa forme, ses propriétés vitales,

son aspect dans les différentes cultures. Il ressemblait aussi au vibron de Koch par ses produits chimiques, révélés par la réaction de Bujwid, et par cet autre fait que les deux microbes pouvaient se servir mutuellement de vaccin pour les pigeons.

J'ai nommé ce nouveau microbe *Vibrio Metchnikovi*, et j'ai émis l'hypothèse que sa ressemblance avec le vibron du choléra asiatique devait tenir à ce qu'ils provenaient l'un et l'autre d'une seule souche qui donnerait deux espèces, l'une par culture dans l'intestin des poules, l'autre dans une autre espèce animale des Indes. Puis, pour éclaircir l'étiologie du choléra humain, qui ne présente, comme on sait, actuellement que des notions contradictoires, j'ai combiné l'étude parallèle des deux vibrions sous le rapport des voies d'infection, de l'exaltation de la virulence, de la vaccination chimique, de la localisation intestinale. Partout, l'analogie a été trouvée parfaite.

Mais, en poursuivant cette étude à Paris, où je n'avais pas les mêmes ressources qu'à Odessa, j'ai renoncé à continuer les passages ininterrompus, et par là coûteux, du vibron virulent sur les pigeons, comme je l'ai fait pendant plusieurs mois à Odessa, et j'ai cultivé ce microbe dans les milieux artificiels.

Sous l'influence de ce changement du milieu de culture, le *vibrio Metchnikovi* s'est légèrement modifié, comme il arrive à tous les microbes, dans sa virulence et dans sa morphologie¹.

C'est cette variété modifiée qui, remise à M. Metchnikoff pour être envoyée à M. Fränkel de Berlin, vient d'être le sujet de l'article de M. Pfeiffer.

Cette introduction était nécessaire pour faire comprendre, comment M. Pfeiffer a pu trouver deux races distinctes chez le *Vibrio Metchnikovi* : l'une qui correspond complètement à celle que j'ai décrite en cultivant sur plaques le sang des pigeons de passage ou le contenu intestinal des animaux, et dont la ressemblance avec le vibron du choléra asiatique n'est pas niée par M. Pfeiffer, et une autre qui ressemble plutôt au vibron de Finkler.

Seulement, M. Pfeiffer a le tort d'appeler atypique la race que j'ai décrite, et typique celle qui ressemble le moins au vibron de Koch. Ce n'est qu'ainsi qu'il peut noter dans ses conclusions de grandes différences morphologiques entre le *V. Metch.* et le *V. de Koch*, tout en concédant dans le texte l'impossibilité de les distinguer au moyen des cultures sur plaques, quand le *Vib. M.* croît « atypiquement ».

M. Pfeiffer reconnaît aussi que pour le diagnostic il faut recourir à la méthode expérimentale, à l'inoculation des animaux.

1. On connaît les mêmes variations chez les vibrions de Koch et de Finkler.

Dans ses recherches expérimentales, M. Pfeiffer, tout en confirmant les résultats principaux de mes travaux, constate, en outre, plusieurs points où il est en contradiction avec moi. Ainsi, par exemple, il a trouvé que les cobayes sont plus résistants au virus que les pigeons. J'ai trouvé le contraire, et il est possible que la différence provienne de ce que l'auteur compare les résultats de l'inoculation sous-cutanée des cobayes à l'inoculation intra-musculaire des pigeons. Puis Pfeiffer assure que les cobayes ne succombent pas au vibrion, si on le leur introduit dans l'estomac alcalinisé, sans léser l'intestin par l'injection de la teinture opiacée. J'ai prouvé le contraire dans un récent article (ces *Annales*, n° XII, 1889).

Plus importante est la différence trouvée dans les lésions anatomiques : Pfeiffer n'a jamais constaté l'émigration leucocytaire dans l'intestin, ni la prédisposition des vibrions pour la localisation intestinale, au point que, sans avoir jamais vu la gastro-entérite des poules que nous avons découverte, il propose cependant de l'appeler une septicémie, quoique les vibrions ne se trouvent pas du tout dans le sang des poules. Ces résultats de Pfeiffer s'expliquent aisément par la différence dans la virulence des cultures. Car, comme nous l'avons du reste indiqué ailleurs, la localisation intestinale des vibrions de Metchnikoff et de Koch dépend de leur virulence, c'est-à-dire des toxines qui les accompagnent. Quant à la modification des lésions, parallèle aux changements de la virulence et des espèces animales inoculées, c'est un fait que nous avons depuis longtemps montré pour la pneumonie. Chez le *Vibrio M.*, nous avons aussi trouvé une race qui ne produit plus de septicémie chez le pigeon, et qui ne peut être décelée dans son sang qu'au moyen de la culture.

J'arrive enfin aux contradictions de M. Pfeiffer concernant la vaccination des animaux. J'avais donné une méthode précise pour vacciner les animaux contre le *Vibrio M.*, comme aussi contre celui du choléra. Pfeiffer ne l'a pas suivie dans ses détails, mais il a pu tout de même vacciner les animaux. Pourtant, il a trouvé que leur immunité n'était acquise qu'au bout de deux semaines après la vaccination, tandis que, chez moi, elle apparaissait toujours le deuxième ou troisième jour. Puis, Pfeiffer n'a pas pu constater la vaccination réciproque entre le *Vibrio M.* et celui du choléra.

Mais ici, la cause de cet insuccès réside uniquement dans les procédés expérimentaux de Pfeiffer. Ainsi, il dit qu'il n'a jamais contrôlé l'immunité, par rapport au *Vibrio M.*, des pigeons inoculés par le choléra, avant deux semaines écoulées depuis l'inoculation; or, j'ai montré que l'immunité des pigeons ne dure souvent pas longtemps.

D'un autre côté, pour contrôler l'immunité, contre le choléra, des

cobayes vaccinés contre le *Vibrio M.*, il a employé la méthode classique de Koch. Et il a trouvé que sur cinq cobayes, un était complètement réfractaire. Mais il attribue cet état réfractaire à l'individualité du cobaye, quoique dans un article précédent il assurât que son virus cholérique donne des résultats sûrs¹ et constants.

Où le virus cholérique donne des résultats constants, et alors le cobaye devait succomber aux inoculations répétées; ou il donne 20 0/0 de survie et d'immunité, et alors il fallait faire des expériences nombreuses et comparatives, ce que M. Pfeiffer n'a pas fait. Quand il le fera, il renoncera sans doute à ses conclusions sur la non-vaccinabilité réciproque entre le V. M. et le vibron du choléra.

Pfeiffer dit encore que la substance vaccinale n'est pas volatile, mais il n'a pas distillé dans le vide, comme nous l'avons fait.

Enfin, je dois protester contre la manière de Pfeiffer de me prêter des opinions que je n'ai jamais émises. Ainsi, il assure que j'ai identifié les deux vibrions de Metchnikoff et de Koch, et il reproduit même comme mien un raisonnement qui n'est pas de moi.

J'ai, au contraire, décrit le *Vibrio Metch.* comme une *nouvelle espèce*, et non pas comme le vibron de Koch trouvé chez les poules, et j'ai même indiqué que les substances toxiques de ces deux vibrions sont différentes, quoique analogues.

Pfeiffer m'attribue, en outre, la supposition que les cobayes sont tués par le vibron introduit dans l'estomac non alcalinisé, quoique dans mon article qu'il cite on trouve la phrase : « Il est probable que les cobayes morts (de ceux qui ont reçu le vibron avec la nourriture) se sont infectés par les poumons, où le virus pouvait parfaitement arriver par la bouche, etc. »

Voilà pour les faits. Quant aux diverses objections théoriques de Pfeiffer, je n'en dirai rien, car il s'appuie dans ses raisonnements sur l'étiologie courante du choléra, créée par Koch, et que nous discuterons ailleurs.

1. *Zeitschrift f. Hygiene*, 7 nov. 1889. Du reste, cette interprétation de M. Pfeiffer est en contradiction avec les données de Koch, qui a constaté que sa méthode d'infection ne confère jamais l'immunité aux cobayes, et ne rencontre pas non plus chez eux d'immunité naturelle.

REVUES ET ANALYSES

ACTION DE L'EAU SUR LES BACTÉRIES PATHOGÈNES.

REVUE CRITIQUE.

GAFFKY. *Mittheil. a. d. k. Gesund.*, 1881. — MEADE BOLTON. Sur la façon dont se comportent diverses espèces de bactéries dans l'eau potable. *Zeitschr. f. Hyg.*, 1866. — CRAMER. L'alimentation d'eaux de la ville de Zurich. *Zurich*, 1885. — WOLFHUGEL et RIEDEL. De la multiplication des bactéries dans l'eau. *Arb. a. d. k. Gesund.*, 1886. — LEONE. Recherches sur les microorganismes de l'eau potable. *Atti d. R. Accad. di Lincei*, série IV, t. I^{er}. — FRANKLAND. *Proceed. of the R. Soc.* 1886. — HOCHSTETTER. Sur les microbes dans l'eau de seltz artificielle. *Arb. a. d. k. Ges.*, 1887. — HERŒUS, *Zeitschr. f. Hyg.*, 1886. — KRAUS. Sur la manière dont se comportent les bactéries pathogènes dans l'eau potable. *Archiv. f. Hyg.*, 1887. — NICATI et RIETSCH. Recherches sur le choléra, 1886. — HUEPPE. Étude hygiénique de l'eau potable au point de vue biologique. *Schilling's Journal*, 1887. — STRAUS et DUBARRY. Recherches sur la durée de la vie des microbes pathogènes dans l'eau. *Arch. de med. expér.*, 1889. — KARLINSKI. Sur la manière d'être de quelques bactéries pathogènes dans l'eau de boisson. *Archiv. f. Hyg.*, 1889. — DI MATTEI et STAGNITTA. Sur la manière d'être des microbes pathogènes dans l'eau courante. *Annali dell' Istituto d'Igiene speriment. di Roma*, 1889.

Que deviennent dans l'eau les microbes pathogènes qui s'y trouvent naturellement ou accidentellement introduits? C'est une question qui a pris de l'importance depuis la nouvelle doctrine étiologique qui fait de l'eau potable l'agent de transport de certaines maladies. Aussi a-t-elle surtout été étudiée en Allemagne, où la doctrine nouvelle, la *Trinkwassertheorie*, a eu à lutter, pour s'implanter, contre la doctrine étiologique de Pettenkofer, la *Grundwassertheorie*. Dans l'une comme

dans l'autre, il ne pouvait être indifférent de savoir ce que devenaient dans l'eau les germes pathogènes qu'y verse constamment le lavage du linge des malades, ou qui y arrivent par des voies plus ou moins obscures, en partant des déjections du malade ou des cadavres ensevelis. Les rapports étroits de la mort et de la vie à la surface du globe nous exposent-ils à retrouver dans nos eaux de boisson des germes de maladie encore vivants, ayant résisté au voyage qu'ils ont dû faire pour y arriver, ou au temps qu'ils ont dû y passer avant de pénétrer chez un hôte nouveau?

Nous étudierons bientôt la première partie de cette question, le passage au travers du sol. Nous ne nous occupons en ce moment que de la seconde, le séjour dans l'eau. Que deviennent dans ce liquide les microbes pathogènes les mieux connus, tels que la bactériidie charbonneuse, ou encore ceux dont on a le plus de droit de suspecter le transport par l'eau, tels que les germes de la fièvre typhoïde ou du choléra? Avant d'entrer dans l'examen des travaux consacrés à cette recherche, nous ferons, comme à l'ordinaire, le bilan des difficultés de la question, des erreurs auxquelles on est exposé dans son étude, et des moyens à employer pour les éviter. Cela nous permettra de distinguer, dans les travaux originaux, ceux qui méritent créance et ceux dont a le droit de se méfier, de sorte que si nous les trouvons en contradiction, nous pourrons faire entre eux un choix, sinon sûr, du moins raisonné.

La question posée semble au premier abord assez facile à résoudre. On introduit dans une eau des germes déterminés, on les y laisse un temps variable, et on cherche à divers intervalles, par la méthode des plaques ou une autre quelconque, le nombre de germes restés vivants. Le problème paraît bien déterminé; il ne l'est pas à cause du petit mot *eau* qui entre dans son énoncé.

Qu'est-ce que c'est que de l'eau? on ne le sait jamais au point de vue chimique, et personne au monde n'a encore conscience du rôle que peuvent jouer, au point de vue des phénomènes délicats que nous étudions, les variations les plus insaisissables des éléments en solution ou en suspension dans l'eau. Rappelons-nous cette notion qui résulte d'un si grand nombre de faits. La vie d'un être vivant est un réactif infiniment plus délicat que nos réactifs chimiques les plus puissants. De plus c'est un réactif qui diffère des autres, en ce qu'il ne donne qu'une seule réaction, mais qu'il la donne sous les influences les plus diverses; c'est une lumière qu'on peut éteindre de façon bien différentes, mais qui ne nous dit rien sur la cause ou sur les causes qui ont présidé à son extinction. Nous ne pouvons faire ici le départ que des plus grosses influences, de celles que nous connaissons le mieux. Nous ne pourrions envisager qu'en gros les autres.

La première à laquelle on songe est celle de la matière vivante contenue dans l'eau. Les germes qu'on y introduit artificiellement tombent dans un milieu déjà habité, habité par des espèces qu'on doit supposer appropriées au milieu, et dès lors entrent en jeu, lorsqu'on veut savoir ce que deviennent les germes introduits, des questions confuses de concurrence de microbes, variables non seulement d'une eau à l'autre, mais dans la même eau à quelques heures de distance. On peut les éliminer en opérant toujours avec de l'eau stérilisée. Remarquons pourtant que la question quitte un peu ainsi le terrain pratique, le seul sur lequel elle ait vraiment de l'importance. Nous verrons qu'heureusement la solution est telle que ce changement n'a pas d'inconvénient.

En second lieu, se présentent les gaz en solution dans l'eau, et parmi lesquels les plus importants sont l'oxygène et l'acide carbonique. Il n'y a guère à se préoccuper des variations du premier. Rien n'égale la rapidité avec laquelle une eau s'aère lorsqu'elle a le contact de l'air, même sans agitation. Il est vrai qu'elle peut être étalée à l'air, sans s'aérer, quand elle est le siège de fermentations ou de putréfactions, comme dans les marécages. Mais nous supposons que l'eau étudiée est de l'eau potable et même de l'eau stérile, ce qui nous permet d'éliminer ce cas particulier de ses rapports avec l'oxygène.

Il faut y regarder de plus près avec l'acide carbonique qui est en général, nous le savons maintenant, une manière d'antiseptique. Cet acide peut être introduit artificiellement dans l'eau, et nous avons alors le cas des eaux gazeuses dont les rapports avec les microbes sont autres que ceux des eaux aérées, et forment un chapitre particulier de notre étude. L'examen de ces eaux gazeuses confine d'un autre côté avec celui des eaux naturelles tenant des bicarbonates en solution, qui renferment généralement moins d'acide carbonique que les eaux gazeuses artificielles, mais s'en débarrassent, par contre, plus lentement au contact de l'air.

Nous arrivons ainsi tout doucement aux sels en solution, sels si variables suivant les origines et la nature de l'eau, sels formés d'éléments dont l'importance individuelle résulte du beau travail de M. Raulin, auquel on arrive toutes les fois qu'on creuse un sujet de biologie. Or, sur ces éléments, dont la qualité et la quantité peuvent avoir un effet si puissant sur la vitalité des microbesensemencés, nous n'avons que les renseignements imparfaits fournis, quand ils le sont, par une analyse faite sur l'eau une fois pour toutes. Cette analyse est bonne à citer, et certains travaux ont eu tort de l'omettre ou de ne donner sur elle que des renseignements insignifiants, tels que le degré de *dureté* ou le titre oxymétrique. Mais, même quand elle existe, elle constitue

un document très mystérieux, et nous fait l'effet d'un de ces blocs qu'on sait recéler une statue. Il en sortira un jour quelque chose, mais nous ne savons encore rien en tirer.

Force est donc de passer condamnation sur ce point, et de laisser dans le vague les causes d'erreur ou d'incertitude qui en proviennent. Nous aboutissons malheureusement à la même conclusion en ce qui touche les matières organiques. Nous avons dit à ce sujet, dans une revue récente, ce qu'on sait, ou plutôt ce qu'on ne sait pas de ces matériaux constitutifs de toutes les eaux. Leur rôle est sûrement important, mais on ne connaît qu'approximativement leur quantité et presque pas leur nature.

On pourrait se mettre à l'abri des deux influences mal définies que nous venons d'énumérer en opérant sur de l'eau distillée : c'est ce qu'ont fait quelques observateurs dont nous rencontrerons les résultats dans le courant de cet exposé. Mais outre que toutes les eaux, même distillées, ne se ressemblent pas, il est clair que sur ce terrain, la question n'a plus guère qu'un intérêt philosophique.

A ces matières organiques se rattache pourtant une cause d'erreur que le moment est venu de viser. Quelques savants n'ont pas pris garde qu'en ensemençant les bactéries dans l'eau à étudier, ils y apportaient en même temps des doses variables du milieu de culture de ces bactéries. Vainement on dira que c'est ainsi que les choses se passent dans la nature, et que lorsque des bacilles typhoïques passent des selles d'un typhisant dans l'eau, elles s'y accompagnent aussi d'un peu de matière organique. Ce n'est pas la première fois que nous insistons sur l'obligation de donner une allure scientifique aux problèmes posés par la pratique, pour pouvoir les résoudre. Or, en ajoutant ainsi de la matière organique à l'eau à étudier, on en change la constitution d'une façon inconnue et impossible à reproduire exactement dans une seconde expérience. Il faut donc ou bien, comme l'a fait Hueppe, faire subir à la semence un lavage préalable à l'eau distillée et stérilisée, soit, ce que j'ai trouvé bien plus commode, plonger dans la culture un tuyau de pipe bouché par une de ses extrémités et dont l'autre sert à aspirer une certaine quantité de liquide. A l'extrémité plongée dans le liquide et desséchée par aspiration, lavée si c'est nécessaire par une nouvelle aspiration d'eau stérilisée, on trouve un peu de dépôt adhérent qui fournit de la semence très pure et très propre.

Je n'ai parlé, dans tout ce qui précède, que des causes d'erreur pouvant provenir de l'eau. Nous voici conduits à nous préoccuper aussi de la semence. On savait depuis longtemps qu'une semence n'est pas toujours identique à elle-même. Mais c'est précisément à propos de l'eau que cette notion s'est étendue. MM. Wolfhugel et Riedel ont vu que, portés du bouillon, de la gélatine, dans l'eau stérilisée, beaucoup

de bacilles du choléra ne réussissent pas à triompher des mauvaises conditions de milieu qu'ils y rencontrent ; mais, dans la masse, il y en a qui prennent le dessus et se multiplient par la suite. La même chose n'arrive pas si les germes sont empruntés à une culture dans l'eau : la résistance est plus grande, les morts moins nombreuses et la multiplication plus rapide. Il faut donc admettre qu'il y a une sorte d'acclimation à subir lors du transport dans un nouveau milieu.

Il est vrai qu'Hochstetter a trouvé précisément le contraire, au moins en apparence. Une semence empruntée à une vieille culture dans l'eau, datant de 290 jours, était morte après 5 heures de séjour dans une nouvelle eau où elle avait été transportée ; sa résistance était ainsi moindre que celle des semences provenant d'un liquide nutritif. Mais il n'y a pas contradiction entre les deux assertions. Des germes peuvent être vivaces après quelques jours de séjour dans l'eau, et fragiles après 10 mois. La même chose arrive bien dans les milieux de culture. Les germes vieillissent peuvent se rajeunir si on les transporte dans un bon milieu, et périr plus vite que les germes jeunes dans un mauvais. Ce qui confirme cette explication, c'est que, dans l'expérience de Hochstetter, la mort après réensemencement a eu lieu en 5 heures, c'est-à-dire au bout d'un temps beaucoup plus court que d'ordinaire. D'un autre côté, que des germes bien portants puissent résister plus facilement que des germes affaiblis à une transplantation dans un milieu médiocre, c'est ce qui résulte des notions générales que nous avons sur les microbes, et de ce fait particulier que Frankland a précisément rencontré à propos de l'eau, que des semences en bon état donnaient une multiplication immédiate quand on les transportait dans une eau où elles périssaient tout d'abord quand elles y avaient été portées vieilles. Comme conclusion, il faudra ici, comme à propos des antiseptiques, se préoccuper d'indiquer l'origine de la semence, et la laisser constante quand on fera une série d'expériences comparatives.

Ce n'est pas là la seule précaution. Il faudra toujours mettre très peu de semence dans l'eau sur laquelle porte l'étude, pour éviter que ceux des éléments de cette semence qui y meurent n'y apportent de la matière organique pouvant servir de nourriture aux autres. Il faudra aussi, comme M. Hueppe l'a montré, veiller à l'égale répartition dans l'eau des microbes ensemencés. Tous ne se prêtent pas facilement à une distribution uniforme ; il en est beaucoup dont les cellules sont rattachées entre elles par des liens gélatineux, et restent au moins pendant quelques heures à l'état de groupes qui se disloquent ensuite. Si on fait avec cette eau une numération de microbes par la méthode des plaques, on peut attribuer à la multiplication de la semence ce qui n'est que le résultat de la dislocation des groupements initiaux. Tel est par exemple le cas pour la bactérie de la fièvre typhoïde, pour

lesquelles M. Hueppe a observé des multiplications apparentes après 1 ou 2 jours à 5°, température à laquelle on sait que cette bactérie est inerte. Rappelons-nous, à ce propos, que M. Geppert ¹ a relevé aussi cette cause d'erreur et donné un moyen d'y remédier.

Enfin, et c'est le dernier point que je voudrais viser, la nature du milieu dans lequel on enfermera les germes sortant de leur contact plus ou moins prolongé avec l'eau, ne sera pas indifférente. Les milieux à la gélatine, si commodes, et qui se prêtent si facilement aux numérations, sont de beaucoup inférieurs, on le sait maintenant, aux bouillons liquides. Telle bactérie qui paraîtra morte lorsqu'on l'ensemencera sur plaques, parce qu'elle n'y fournit pas de colonie, se développera très bien dans un bouillon de même composition, mais sans gélatine. Comme il s'agit, dans notre étude, d'apprécier la vitalité maxima des germes, il est clair qu'en opérant avec des bouillons, nous trouverons des chiffres plus élevés qu'avec des milieux à la gélatine, et que s'il y a contradiction entre les résultats de deux savants étudiant le même microbe, nous saurons tout de suite auquel accorder notre confiance, si celui qui a fait sesensemencements dans du bouillon trouve des nombres plus grands que celui qui a fait des numérations sur plaques.

Nous allons tout de suite éprouver la justesse de ce diagnostic en mettant en regard deux travaux importants, celui de M. Hochstetter et celui de MM. Straus et Dubarry. Le premier ensemencait dans de la gélatine nutritive son eau chargée de germes. MM. Straus et Dubarry se servaient au contraire de bouillon, et l'employaient en outre de façon à rendre l'expérience très probante. Ils font observer que, quand on prélève de la semence dans un flacon pour en faire une culture sur gélatine, la quantité d'eau prélevée est toujours très faible : on a beau multiplier les plaques, on n'arrive jamais à mettre en expérience qu'une quantité minime de l'eau à explorer. Que les germes vivants s'y fassent rares, on est exposé à ne pas les rencontrer en puisant, et à croire que tous sont morts, lorsqu'il y a encore quelques survivants. Or, ce ne sont pas les morts qui nous intéressent, ce sont les autres. Pour savoir s'il en reste, MM. Straus et Dubarry ajoutent un peu de bouillon concentré dans le matras contenant l'échantillon d'eau à étudier, de façon à faire du tout un milieu de culture qui se peuple, s'il y reste quelque chose de vivant.

Pour toutes ces raisons, ils doivent avoir trouvé des nombres très supérieurs à ceux de Hochstetter, ainsi qu'on pourra le voir en comparant les premières lignes de chacun des tableaux qui suivent, et que j'ai dressés de façon à rendre la comparaison facile.

1. Ces *Annales*, t. III, p. 673.

Hochstetter a étudié comparativement l'eau distillée, l'eau des conduites de Berlin, et l'eau de Seltz artificielle faite avec ces mêmes eaux de conduite. Malheureusement les conditions d'expérience n'étaient pas les mêmes pour toutes.

L'eau de Seltz étaitensemencée, *sans stérilisation préalable*, au moyen d'une seringue Pravaz dont la canule, longue, pointue et fermée à son extrémité, traversait le bouchon de la bouteille. Une ouverture latérale, moins exposée que l'ouverture terminale à se boucher en passant au travers du liège, permettait l'ensemencement. On agitait le flacon pour bien répartir la semence dans la masse, on retirait la canule, on fermait le trou avec une petite cheville de bois, et on portait à la cave. La pression gazeuse ne subissait aucune modification sensible pendant l'opération. Nous retrouverons bientôt ces expériences. Pour le moment, nous pouvons en laisser les résultats de côté. L'eau distillée et l'eau de canalisation de Berlin étaient introduites dans des flacons fermés à la ouate, *stérilisées*, etensemencées comme l'eau de Seltz. On étudiait de temps en temps toutes ces eaux par la méthode des cultures sur plaques.

Ont été examinées par cette méthode 13 espèces d'organismes dont 8 pathogènes bien connus. Parmi ces espèces non pathogènes, il y a trois espèces mal décrites, le bacille α , donné comme pathogène pour le cobaye par les voies digestives, et les bacilles vert fluorescent et jaune, qui sont des bacilles de l'eau, ne liquéfiant pas la gélatine.

Voici le tableau indiquant, pour ces espèces, la plus courte et la plus longue limite de résistance trouvée dans l'eau de Seltz et dans les deux autres eaux étudiées; quand il n'y a qu'une seule limite indiquée, c'est la plus longue.

	Eau de Seltz.	Eau distillée.	Eau de Berlin.
Bacille du charbon.	15 m. à 1 h.	3 jours.	3 jours.
— choléra	3 heures.	24 heures.	392 jours.
— typhus.	5 à 12 j.	5 jours.	7 jours.
<i>Micrococcus tetragenus</i> . . .	8 à 11 j.	18 jours.	18 à 30 j.
Bac. de la septic. du lapin.	30 m. à 1 j.	30 m. à 2 j.	»
— de Finkler Prior . . .	4 heures.	4 heures.	2 jours.
Bacille α	20 à 60 j.	14 jours.	97 jours.
— vert.	14 jours.	plus de 14 j.	plus de 14 j.
— jaune	77 jours.	19 jours.	plus de 208 j.
Levure rose.	10 jours.	plus de 172 j.	plus de 247 j.
<i>Microc. prodigiosus</i>	plus de 10 j.	7 jours.	plus de 100 j.
— <i>aurantiacus</i>	18 jours.	214 jours.	214 jours.
Spores de charbon.	plus de 154 j.	plus de 154 j.	plus de 154 j.

Les spores d'*aspergillus flavescens* se sont aussi montrées très résistantes dans les 3 espèces d'eaux.

Voici maintenant un tableau qui résume de la même manière les résultats de MM. Straus et Dubarry.

	Eau distillée.	Eau de l'Oureq.	Eau de la Vanne.
Bacille du charbon	»	28 jours.	65 jours.
— choléra	14 jours.	30 jours.	39 jours.
Bacille de la fièvre typhoïde.	69 jours.	81 jours.	43 jours.
<i>Mic. tetragenus</i>	49 jours.	plus de 49 j.	»
Bac. de la tuberculose . . .	plus de 115 j.	plus de 95 j.	»
— de la morve	57 jours.	plus de 50 j.	plus de 28 j.
<i>Strept. pyogenes</i>	40 jours.	44 jours.	15 jours.
<i>Staphyl. pyog. aureus</i> . . .	13 jours.	plus de 49 j.	
Bac. du pus vert	plus de 13 j.	plus de 20 j.	plus de 73 j.
Bac. de Friedlaender	8 jours.	7 jours.	»
Mic. du chol. des poules . .	8 jours.	30 jours.	»
Bac. du rouget des porcs . .	plus de 34 j.	plus de 17 j.	»
Bac. de la septic. des souris.	plus de 49 j.	plus de 20 j.	

On voit, en comparant dans leur ensemble les quatre premières lignes de ces deux tableaux, qui se rapportent aux mêmes espèces, que, conformément à nos prévisions basées sur l'étude des méthodes de travail, les nombres trouvés par MM. Straus et Dubarry sont en moyenne tous supérieurs à ceux de M. Hochstetter. Sont-ils eux-mêmes, en moyenne, inférieurs à la réalité? Sans aucun doute. Si nous connaissions un très bon milieu de culture pour le bacille du choléra ou celui de la fièvre typhoïde, nul doute que nous ne le retrouvions vivant après des périodes de séjour dans l'eau qui ont paru lui enlever toute puissance de développement, quand on l'ensemait dans ses milieux ordinaires. C'est ce dont j'ai eu l'occasion de me convaincre vingt fois, dans le cours de mes études sur la vitalité des germes. Nous voilà donc amenés à considérer d'une manière générale tous les nombres trouvés jusqu'ici dans cette étude comme des nombres minimum, et ceux qui ont été trouvés au moyen des cultures sur milieux à la gélatine comme probablement très inférieurs à la réalité. L'eau est donc un milieu de culture, ou au moins un milieu où la vie peut s'entretenir longtemps. A vrai dire, cette conclusion n'a rien d'imprévu, et elle n'a d'importance que parce qu'on l'avait escomptée d'avance, en l'acceptant et en la niant dans les discussions ouvertes sur le rôle des eaux dans les maladies épidémiques.

Mais les tableaux ont un autre avantage que celui de nous avoir fourni, de prime-saut, cette conclusion importante et à laquelle nous allons revenir tout à l'heure. Ils nous permettent encore d'entrer dans le détail, sans nous y noyer, ce qui est le danger de ces *Revue critiques*. Nous n'avons pour cela qu'à les étudier en long et en large.

Nous pouvons, en les lisant en long, faire séparément l'étude de l'eau distillée, des eaux naturelles et des eaux gazeuses; en les lisant en large, grouper de même les résultats obtenus par divers expérimentateurs pour une même espèce de bactéries, surtout pour les bactéries pathogènes. Nous commencerons par l'étude de l'eau distillée.

Eau distillée. — Il ressort immédiatement des tableaux ci-dessus une conséquence générale que ne contredisent pas les autres travaux sur la matière, et qui est d'ailleurs tellement dans l'ordre des choses à prévoir que nous pouvons l'enregistrer de suite comme sûre, c'est que l'eau distillée est moins favorable à la conservation des microbes que l'eau de boisson ordinaire : c'est évidemment la pauvreté du milieu liquide qui entre en jeu. Mais cette question a trop peu d'intérêt pratique pour que nous y insistions, et que nous discutions les différences qu'on pourrait relever par exemple entre les résultats de Hochstetter, de Straus et Dubarry, et ceux de Meade-Bolton. Nous retrouverons cette discussion à propos des eaux ordinaires.

Eaux gazeuses. — Nous serons également très brefs au sujet des eaux chargées d'acide carbonique. Dans les expériences de Hochstetter, elles ont tué plus rapidement que l'eau ordinaire les microbes étudiés, sauf les spores du charbon et celles de l'*aspergillus flavescens*. Il y a donc une influence réelle de l'acide carbonique. La pression dans les bouteilles n'est sûrement pour rien dans la destruction rapide des germes du choléra par exemple, car on arrive au même résultat en faisant passer dans de l'eau ordinaire un courant d'acide carbonique sans pression : c'est donc le gaz qui agit. La cause de l'activité du milieu est autre que dans l'eau distillée. Aussi les résultats sont différents. L'eau de Seltz est plus rapidement mortelle que l'eau distillée pour le *mic. aurantiacus*, le *mic. tetragenus*, la levure rose, le bacille vert et le bacille du choléra. Elle l'est moins pour le *mic. prodigiosus*, le bacille α et le bacille jaune.

Ici encore, nous aurions à relever des différences avec les résultats d'autres savants, par exemple ceux de Leone; mais la discussion aura plus d'utilité pratique avec les eaux ordinaires. Contentons-nous de conclure que l'usage de l'eau de Seltz, recommandé en temps d'épidémie, peut en effet être recommandable, surtout si on laisse vieillir l'eau quelques jours. On a *chance* d'y voir diminuer ou même périr les germes nuisibles, mais la garantie est médiocre pour quelques-uns, comme par exemple celui de la fièvre typhoïde, qui peut persister plus longtemps dans l'eau de Seltz que dans l'eau distillée ou l'eau de canalisation. La seule eau vraiment recommandable est donc l'eau stérilisée par la chaleur ou par une bonne filtration.

Eaux ordinaires. — Ici, nous devons insister un peu plus, le sujet étant plus important et plus encombré de résultats en apparence con-

tradiatoires. Nous avons dit, comme règle générale, que quand on transporte dans une eau ordinaire stérilisée des germes de microbes, un certain nombre y périssent les premiers jours, amenant une diminution largement compensée ensuite par une multiplication, qui, lorsque le milieu est épuisé, fait place à son tour à une diminution nouvelle. Ces trois périodes ont été retrouvées depuis dans un grand nombre de cas. Il n'est donc pas étonnant qu'elles existent pour l'eau qui est aussi un milieu de culture. Mais c'est un milieu pauvre, parfois très pauvre, et on est exposé dès lors, avec elle, à voir ces périodes se fondre les unes dans les autres.

Voici, par exemple, Meade-Bolton qui, en ensemençant des bactéries diverses dans de l'eau distillée, dans de l'eau de canalisation de Göttingen, pauvre en matière organique, et dans de l'eau très chargée d'un puits, peu utilisée et riche en nitrate, a vu dans tous ses essais, qu'ils fussent faits à 18-22°, ou à 35°, survenir une diminution continue et progressive dans le nombre des bactériesensemencées, jusqu'à disparition totale ou du moins jusqu'à cessation de tout développement sur la gélatine. C'est que la première et la seconde période ont échappé à M. Meade-Bolton, ou qu'elles n'ont pas existé. L'eau de distribution de Göttingen était très pauvre en matières organiques; celle du puits en renfermait beaucoup, mais M. Meade-Bolton fait remarquer lui-même que la quantité cède le pas à la qualité. En remplaçant ces eaux d'expérience par un bouillon de peptone très étendu, on voit reparaître les phénomènes de multiplication observés dans d'autres eaux. Il n'y a donc pas à insister sur ces différences dans le nombre et la durée des périodes de l'évolution de la semence dans l'eau; elles sont dans la nature des choses et dépendent sûrement de la proportion dans l'eau de ces matières minérales et organiques sur lesquelles nous avons passé condamnation en commençant.

Nous nous débarrassons, avec cette remarque, d'une multitude de faits menus et contradictoires dont l'existence ou l'absence sont indifférentes pour l'établissement de cette conclusion définitive, commune à tous les savants qui se sont occupés de la question, c'est que les germes introduits dans l'eau finissent par y périr au bout d'un temps plus ou moins long. Seulement, les périodes sont variables de l'un à l'autre, d'une eau à l'autre. Elles dépendent évidemment aussi de l'action de la température, sur laquelle nous ne savons encore rien. Nous voici donc obligés d'entrer davantage dans le détail, et d'étudier en large les tableaux ci-dessus, après les avoir étudiés en long.

Nous y choisirons pour cela la bactérie dont les rapports avec l'eau ont été le plus étudiés, celle de la fièvre typhoïde. Nous laisserons de côté désormais toute étude des variations possibles dans les trois périodes d'évolution après ensemencement. Comme elles aboutissent d'or-

dinaire à une destruction des microbes, ce qui nous intéresse est de savoir le temps qu'a mis à périr chacun de ces microbes ensemencé dans une eau.

Bacille typhique. — Avec l'eau de la Panke, qui est la Bièvre de Berlin, et dont le résidu d'évaporation perd au rouge 0^{gr},250 par litre, MM. Wolfhugel et Riedel ont vu que le bacille typhique pouvait se multiplier, au lieu de périr, quand les circonstances de température sont favorables (16° et au-dessus). Il reste vivant sans se développer aux températures basses (au-dessous de 8°). On obtient le même résultat en étendant l'eau de la Panke d'eau distillée. C'est que cette eau renfermait probablement, au moment où elle a été mise à l'épreuve, des substances très nutritives. Avec des eaux plus pures et mieux faites pour servir d'eaux de boisson, il y a, suivant les cas, tantôt multiplication et survie, et tantôt mort. Dans l'eau des conduites de Berlin, on trouvait encore, après 20 jours, des germes vivants, tandis que Meade Bolton n'en avait pas trouvé après 14 jours, et Hochstetter après 5 jours. A Wiesbaden, M. Hueppe a trouvé, entre 10 et 20°, des germes encore vivants après 20 et 30 jours. Dans l'eau d'un puits très contaminé, il a vu des bacilles typhiques ensemencés persister encore le 13^e jour et disparaître le 16^e.

Toutes ces contradictions entre des savants qui ont employé la même méthode des cultures sur gélatine tiennent en grande partie, sans aucun doute, à des différences dans les qualités nutritives de la matière organique des diverses eaux. Le bacille typhique est, sous ce point de vue, très peu exigeant. Bolton a vu qu'il se contentait de 67 milligrammes par litre de la matière organique d'un bouillon peptonisé alcalin dont il fallait 400 milligrammes pour faire vivre les bacilles du choléra. Cette absence de besoins peut le rendre, dans certains cas, très vivace. Nous le voyons, en effet, résister à 81 jours de séjour dans l'eau de l'Ourcq à 20°, dans les expériences de MM. Straus et Dubarry. Nous prendrons, suivant la remarque faite plus haut, ce dernier chiffre comme le plus voisin de la réalité, et nous dirons qu'il faut parfois près de 3 mois pour amener la disparition du bacille typhique de l'eau potable stérilisée qu'il a envahie.

Bacille du choléra. — Ici les résultats sont des plus contradictoires. Babes, Wolfhugel et Riedel, Frankland l'ont vu périr en moins d'un jour dans l'eau distillée, lorsqu'il ne contenait pas de spores. Ces résultats sont en désaccord avec ceux de MM. Nicati et Rietsch, qui ont retrouvé des germes vivants après 20 jours passés dans l'eau distillée. Mais ces savants ont opéré en ensemencant cette eau « avec quelques gouttes d'une culture pure très riche en virgules » ; il est clair qu'ils avaient ainsi mis leur eau distillée dans les conditions d'une eau ordinaire. MM. Straus et Dubarry ont trouvé 14 jours pour l'eau

distillée, et ce chiffre, plus faible que celui du bacille typhique (69 jours), est bien en rapport avec ce qu'on sait sur les exigences alimentaires si différentes des deux bacilles.

Dans les eaux de boisson, la vitalité est plus grande, mais on est très embarrassé pour en fixer la limite, tant les variations entre les résultats de divers expérimentateurs dépassent celles qu'on peut attribuer légitimement aux différences entre les conditions ou les méthodes opératoires. Les mêmes savants ont quelquefois trouvé des nombres très différents. Ainsi Wolfhugel et Riedel ont vu le bacille virgule disparaître quelquefois après 2 jours de séjour dans l'eau de Berlin, et quelquefois persister plus de 7 mois, et même, d'après Riedel, plus d'un an. On trouve de même 392 jours dans le tableau de M. Hochstetter. Pfeiffer a trouvé des nombres analogues.

Fabes, Hueppe, Straus et Dubarry ont obtenu des nombres intermédiaires entre ces extrêmes. La seule conclusion à tirer de ces contradictions, c'est qu'il est entré en jeu des influences qui ont passé inaperçues. Peut-être n'a-t-on pas pris assez garde à l'influence de la lumière sur ces eaux contenant des germes? Peut-être se forme-t-il dans l'eau des spores plus résistantes? C'est au moins ce que MM. Straus et Dubarry ont bien vu pour la bactériodie charbonneuse dans l'eau distillée. Il est vrai que la spore du bacille du choléra est beaucoup moins connue que la spore charbonneuse; mais nous retrouverons cette question tout à l'heure.

Il y a pourtant quelque chose à tirer des résultats contradictoires que nous venons de signaler, c'est ce qui est relatif à l'influence des températures. Nous aurions pu déjà remarquer tout à l'heure, à propos du bacille typhique, que les savants qui, comme Kraus, Karlinski, di Mattei et Stagnitta, s'étaient attachés à étudier les eaux en les laissant dans leurs conditions naturelles de température, qui oscillent entre 8 et 12°, avaient trouvé en moyenne pour la vitalité de ce bacille des nombres inférieurs à ceux qu'ont trouvés ceux qui ont maintenu leurs eaux à 18 ou 20°. C'est ainsi que Kraus trouve 5 jours, Karlinski 6 jours, di Mattei 4 jours, là où Wolfhugel et Riedel trouvaient 13 jours, et Straus et Dubarry des nombres encore supérieurs. Il en est de même pour le bacille du choléra. Kraus a trouvé 1 jour et Karlinski 3, dans les eaux d'Innsbruck à leur température naturelle, pour la vitalité de ce bacille, que nous avons vue si longue entre les mains de Riedel et d'Hochstetter. Voilà évidemment une grosse influence qu'on pourrait mettre en évidence aussi pour d'autres microbes. Nous n'insisterons pas. Bornons-nous à conclure qu'à la température ordinaire de l'eau de source et surtout du sol à petite profondeur, les bactéries du choléra, comme du reste celles de la fièvre typhoïde, vivent moins longtemps dans l'eau que si elles sont à

la température de nos appartements, des réservoirs de cuisine, etc. Mais il suffit qu'un de ces réservoirs ait reçu un germe de bacille virgule pour que celui-ci *puisse* s'y conserver vivant plus d'un an.

A la vérité, cela n'arrivera pas toujours, et nous ne pouvons pas dire encore quand le fait se produira; mais il suffit évidemment qu'il puisse se produire pour que nous ayons à nous mettre en garde contre lui. C'est là l'enseignement pratique éloquent des faits qui précèdent. Il est vrai qu'on a le droit de s'y refuser en alléguant que nous ne pouvons encore parler que des eaux stérilisées, qui n'existent pas pratiquement dans la nature. Mais une eau est d'autant plus disposée à se comporter comme une eau stérile qu'elle est plus pure, et, par conséquent, ce sont les eaux sur lesquelles nous comptons le plus qui peuvent présenter, à un moment donné, le danger que nous venons de signaler.

Bactéridie charbonneuse. — Nous avons conservé, pour le mettre à cette place, le *bacillus anthracis*, parce qu'il introduit dans la question un élément nouveau : celui qui résulte de l'existence de la spore. Avec le bacille du choléra, on ne connaît aucun moyen assuré de différencier l'arthrospore. Avec le bacille typhique, les procédés de double coloration de Babes ne paraissent encore avoir réussi qu'entre ses mains. En tous cas, les bacilles munis des spores de Gaffky semblent se comporter dans l'eau comme ceux qui n'en ont pas. C'est ce qu'ont vu Hueppe, Hochstetter, Meade-Bolton. Hueppe dit, il est vrai, avoir relevé quelques différences avec l'eau de puits; mais ces différences n'étaient ni constantes ni bien marquées. Si donc les spores sont pour quelque chose dans les variations de résistance signalées plus haut pour un même bacille, celui du choléra, dans la même eau, cette influence n'a pas encore été mise nettement en lumière.

Il en est autrement pour la bactéridie charbonneuse. Les formes végétatives avaient paru très fragiles à Hueppe, Meade-Bolton, Hochstetter, qui se servaient des cultures sur gélatine. Chez tous, elles étaient mortes en moins de 8 jours, et si MM. Wolfhugel et Riedel les avaient vues persister plus longtemps dans l'eau de la Panke, on pouvait leur dire que cette eau était une espèce d'eau d'égout.

MM. Straus et Dubarry les ont vues vivre 1 et 2 mois dans l'eau. Ils assignent, en revanche, une période de 131 jours pour la vitalité des spores qui se forment dans l'eau distillée. Ils auraient sûrement trouvé des nombres encore plus élevés pour les spores charbonneuses plongées dans l'eau ordinaire.

Ce qui le prouve, c'est que tous les savants, qui ont trouvé si fragiles les bacilles adultes, ont trouvé les spores très résistantes. Nægeli et Koch les avaient vues durer un an dans l'eau. Meade Bolton avait trouvé qu'après 3 mois à 20° elles étaient intactes, tandis qu'elles

étaient mortes après le même temps à 35°. Les basses températures seraient donc plus favorables à la conservation. C'est sans doute que le travail végétatif n'y commence pas. Enfin, nous avons vu qu'Hochstetter les avait trouvées vivantes et encore très virulentes après 154 jours, entre 13° et 20°. Mêmes résultats chez MM. di Mattei et Stagnitta. Ces notions ne sont pas, il est vrai, de celles qui surprennent pas leur nouveauté, mais il n'en est pas moins intéressant de les voir traduites par des chiffres.

Eaux non stérilisées. — Dans l'eau ordinaire, en dehors des causes de destruction rencontrées dans l'eau stérile, les microbes ensemencés ont en outre à lutter contre la concurrence des bactéries de l'eau, en général mieux appropriées à ce milieu, et, par conséquent, le plus souvent redoutables. Mais on peut prévoir aussi, théoriquement, l'existence d'un de ces phénomènes de symbiose si fréquents dans le monde des infiniment petits, et où deux espèces associées, s'aidant l'une l'autre, durent plus longtemps que si elles étaient isolées. L'expérience est donc ici plus complexe que tout à l'heure, et nous n'avons aucune chance d'y voir disparaître les inégalités que nous avons signalées. Elles iraient plutôt en s'accroissant.

Ainsi Wolfhugel et Riedel, en ensemençant des bacilles du choléra dans les eaux de conduite de Berlin, des eaux de puits et de l'eau de la Sprée, ont vu qu'à 16 et 22° la semence périssait souvent en 2 jours. Kraus a observé les mêmes résultats pour l'eau de Mangfall, à Munich, maintenue à 10°. Hueppe, avec les eaux des puits de Wiesbaden, a trouvé parfois des germes cholériques encore vivants après 5 et 10 jours, entre 16 et 20°. Enfin Hochstetter les a vus persister 267 et 382 jours dans de l'eau de conduite très souillée, maintenue à la température de la chambre.

Pour le bacille de la fièvre typhoïde, mêmes résultats. Pour donner une idée de ce qu'exige et de ce que donne une expérience sur ce sujet, nous n'avons qu'à résumer les résultats de Hueppe. Hueppe a ensemencé des cultures sur pomme de terre, vieilles de 5 jours, dans de l'eau de puits, très impure, mais ne renfermant pas de microbes fournissant sur la gélatine des colonies pouvant être confondues avec celles du bacille typhique. Dans 8 expériences sur 10, faites à 10°, ce bacille avait disparu le 15^e jour, et le 5^e dans les deux autres. De 16 à 20°, sur 10 essais, il y en a eu 4 où on n'a plus trouvé de bacilles typhiques le 5^e jour, 4 où il y en avait encore au bout de 10 jours, un où on en a encore trouvé après 30 jours. Le 10^e essai est resté indécis. Voici, pour l'essai où les bacilles typhiques ont eu la résistance plus longue, les nombres fournis par l'expérience pour ces bacilles et pour les bactéries de l'eau.

	A l'origine.	1 jour.	5 jours.	10 jours.	20 jours.	30 jours.
Bacilles typhiques. .	1600	760	95	96	70	70
Bactéries de l'eau. .	720	12,000	160,000	240,000	700,000	50,000

A voir le mode de croissance et de décroissance de ces nombres, on se trouvera amené à l'idée tant de fois émise dans ces *Annales*, que, sous leur apparente homogénéité, tous les bacilles d'une même semence ne se ressemblent pas, et qu'il y en a de beaucoup plus résistants les uns que les autres.

Remarquons maintenant que si on comparait uniquement ces résultats de Hueppe, obtenus avec l'eau ordinaire, avec ceux de Hochstetter, obtenus avec l'eau stérilisée, on se trouverait amené à conclure que la présence d'autres bactéries dans l'eau favorise la vitalité du bacille typhique. Sans aller jusqu'à cette conclusion, qui serait évidemment excessive, si on la généralisait, nous pouvons dire au moins que la concurrence des bactéries de l'eau n'est pas une sécurité de plus; que si, d'une manière générale, l'eau est un milieu peu favorable aux microbes pathogènes, elle ne l'est pas toujours, et qu'il est toujours prudent de la traiter comme si elle ne l'était jamais.

Nous nous trouvons confirmés dans notre méfiance par la remarque suivante : alors même que nos expériences eussent été plus nettes qu'elles le sont, et auraient assigné, dans des conditions données, une limite fixe à la vitalité des microbes, il eût été prudent de ne pas généraliser et de ne pas étendre à la grande nature leurs résultats, à cause de ceci que, dans nos matras, l'expérience se fait sur un liquide homogène, tandis que, dans la nature, l'hétérogénéité est le caractère dominant de toute eau dormante ou courante. Dans une eau dormante, il se forme des colonies animales ou végétales différentes suivant les lieux; dans une eau courante, l'afflux des eaux superficielles ou des eaux de sources modifie constamment la composition en divers points. MM. di Mattei et Stagnitta ont bien essayé de se rapprocher davantage des conditions naturelles en maintenant dans un courant d'eau continu les microbes dont ils voulaient éprouver la résistance. Ils en imprégnaient pour cela des fils qu'ils plongeaient dans un tube de verre parcouru constamment par l'eau *Marcia* de Rome. Sans entrer dans le détail de leurs résultats, ils ont vu que les microbes périssaient plus vite dans l'eau courante que dans l'eau dormante. Mais il est clair qu'il n'y a rien dans ces expériences qui rappelle, même de loin, l'inégalité de composition, d'exposition, ou de température des divers points d'un même marais ou d'un même fleuve. Les différences dans les productions locales des plantes ou des algues doivent exister *a fortiori* pour les cultures de microbes. On s'explique ainsi que l'on ait pu quelquefois retrouver des bacilles du choléra ou des bacilles

typhiques vivant dans des réservoirs ou dans des puits, et qu'aucune des constatations qui précèdent ne puisse servir d'argument contre la possibilité ni même contre la probabilité du transport des germes pathogènes par l'eau potable.

Nous sommes ainsi tout naturellement conduits à nous demander ce qu'il faut penser de ce mode de transport, et pour cela à passer en revue les arguments que la théorie de Pettenkofer et la *Trinkwassertheorie* ont accumulés, chacune pour son compte. C'est ce que nous ferons dans une revue prochaine.

Dx.

M. R. PFEIFFER. « *Vibrio Metchnikovi* et ses rapports avec le choléra asiatique. » *Zeitschr. f. Hygiene*, 1889.

Le *Vibrio Metchnikovi* (1) apparaît en moyenne plus court, plus épais et plus courbe que les vibrions en virgule de M. Koch ; son mode de mouvement est également distinct. On lui trouve une certaine tendance à se tordre en spirite, mais la forme n'en est pas constante. Dans des solutions colorées faibles, les extrémités du bacille et parfois aussi quelques points intermédiaires prennent la couleur d'une manière plus intense que le reste, et alors tout le microbe affecte l'apparence d'un bacille chargé de spores ; mais en réalité tel n'est pas le cas, et de véritables spores n'ont pu être constatées. Sur la gélose, le microbe pousse abondamment ; à la température du corps animal, il se forme, déjà au bout de quelques heures, des couches épaisses d'une couleur jaune, qui rappellent les cultures du bacille de Deneke et de Finkler, ou celles du microbe du choléra asiatique. Sur la pomme de terre on obtient des cultures maigres, et le microbe ne pousse qu'à la température du corps animal. Les bouillons se troublent déjà au bout de quelques heures (températures de l'étuve) ; après 24 heures, il surnage à la surface une couche mince de couleur blanchâtre, le reste du liquide conservant son aspect trouble. En ajoutant de l'acide chlorhydrique ou sulfurique aux cultures de bouillon vieilles de 24 heures, on obtient une coloration rose, presque pourprée, impossible à distinguer de la réaction caractéristique des cultures de choléra. Les cultures plus vieilles donnent une coloration plus forte, qui, dans celles de 8 à 14 jours, passe cependant au jaune-rouge.

A l'ensemencement par piqûre, et dans les cultures de gélatine en général, le *Vibrio Metchnikovi* pousse avec une rapidité jusqu'à deux

1. V. les articles de M. Gamaléia dans les nos 9 et 10 du vol. II de ces *Annales*.

fois plus grande que celle du microbe du choléra. Sur des plaques de culture, déjà au bout de 16 heures, on distingue à l'œil nu des colonies qui grandissent rapidement, et liquéfient le substratum tout à fait à la manière des bacilles de Finkler. Cependant il se trouve des colonies qui sont relativement en retard et ne laissent distinguer la liquéfaction (à l'œil nu) qu'au bout de 48 heures. Celles-ci présentent des points blancs au centre de cavités rondes, qui sont remplies d'un liquide clair, et rappellent ainsi de vieilles cultures typiques de choléra. Enfin, il se trouve des colonies qui en apparence ne liquéfient pas la gélatine du tout; celles d'entre elles qui poussent dans la profondeur apparaissent d'une couleur jaune clair, de contours ronds on légèrement onduleux, tandis que les colonies de la surface ont une couleur blanche claire et se disposent en couches fines à contours entaillés. Ce n'est qu'au bout de 4 à 5 jours que ces colonies commencent à liquéfier le substratum, et alors elles s'approchent d'un type précédemment décrit. Au point de vue morphologique et biologique, ces colonies se montrent néanmoins sous tous les rapports parfaitement analogues aux autres, qui liquéfient la gélatine à la manière du microbe de Finkler.

L'aspect des cultures n'offrant pas, de cette manière, de distinctions bien nettes entre le *Vibrio Metchnikovi* et les microbes du choléra, il faut avoir recours, pour les distinguer, à la réaction du corps animal. Le réactif le plus sensible serait présenté par le corps du pigeon, qui montre pour le *Vibrio Metchnikovi* une réceptivité excessive. Il suffit de lui introduire dans les muscles pectoraux une prise de culture adhérent à l'extrémité d'une aiguille en platine, pour que l'animal succombe en moins de 20 heures avec des symptômes d'une maladie nettement caractérisée.

Le muscle inoculé se montre gonflé et nécrosé, et est imbibé d'un liquide fourmillant de microbes; le cœur est dur et rempli de sang coagulé; les poumons sont riches en sang; la rate et le foie, au contraire, exsangues et lâches. Le sang du cœur et la pulpe des organes contiennent d'énormes quantités de vibrions. L'intestin est pâle et modérément rempli d'un liquide contenant des masses de cellules épithéliales desquamées, mais très peu de microbes. Des leucocytes n'ont pas été trouvés non plus dans le contenu intestinal, même après inoculation de virus faibles.

L'infection par la bouche reste presque inoffensive, et les pigeons supportent des doses considérables (jusqu'à 5^{cc}), même après neutralisation préalable du gosier et de l'estomac.

Les souris se montrent assez réfractaires, tandis que les cobayes, au contraire, manifestent pour ce microbe une réceptivité particulière, tout à fait analogue à celles des pigeons. Le moyen d'infection le plus efficace est, dans ce cas aussi, celui de l'injection sous-cutanée; 1^{cc} de

sang infecté de pigeon suffit pour tuer infailliblement l'animal, tandis que l'infection par une aiguille de platine laisse un certain nombre de survivants. Les symptômes cliniques de la maladie sont chez le cobaye d'une régularité parfaite. Au bout de deux heures se manifeste une élévation de la température de 1 à 2 degrés centigrades; bientôt l'élévation est remplacée par un abaissement qui va parfois au-dessous de 33°; le train de derrière paraît comme paralysé, et l'animal meurt, souvent avec des crampes, au bout de 18 à 20 heures. L'autopsie montre des symptômes rappelant complètement ceux que l'on observe chez le pigeon.

Pour l'infection par la voie digestive, la neutralisation et le repos du canal est une condition indispensable. A l'autopsie, on trouve l'intestin enflammé et de couleur pourprée, contenant des vibrions, qui se retrouvent encore dans le sang du cœur. En général c'est le sang, et non pas l'intestin, qui doit être reconnu pour être le foyer principal de la maladie.

L'injection de cultures stérilisées produit sur les pigeons et les cobayes une action morbifique excessivement accusée dont la puissance est en dépendance directe avec l'âge de la culture, à savoir avec le temps qui avait été laissé au microbe d'y déposer ses produits. Les cultures stérilisées après 3 à 5 jours de développement (à la température de 37°), injectées au cobaye, aux doses de 1 à 5^{cc}, produisent une maladie des plus nettes, mais l'animal survit, tandis que l'injection de cultures stérilisées vieilles de 20 jours, même à la dose de 2^{cc}, produit la mort presque infailliblement. Le produit de distillation n'a plus cet effet. Les symptômes cliniques ont une analogie avec ceux que l'on observe après l'injection de cultures vivantes. Si l'animal survit à l'inoculation, la température commence par s'abaisser; en 1 ou en 2 heures, elle tombe de 2 degrés environ, pour s'élever d'autant dans les deux heures suivantes; après quoi tous symptômes commencent à disparaître, et, au bout de 24 heures, l'animal paraît complètement rétabli. Après l'injection de doses très faibles, l'abaissement de température est à peine sensible et semble disparaître; au contraire, si la dose est mortelle, c'est l'élévation qui manque, et l'abaissement continue sans interruption jusqu'à la mort, qui survient en 36-48 heures. L'autopsie montre absolument les mêmes symptômes qu'après infection par des cultures vivantes; seulement, dans le cas où la période de la maladie était plus longue (au-dessus de 48 heures), il s'y ajoute une espèce d'engraissement des cellules du foie, qui paraît alors fragile, augmenté de volume et d'une couleur jaune claire.

L'immunité des cobayes et des pigeons peut être obtenue par l'injection de doses supportables de cultures stérilisées pendant 14 jours. Plusieurs cobayes ainsi rendus complètement résistants contre le

Vibrio Metchnikovi, furent essayés par rapport au microbe du choléra asiatique, et de 5 il en mourut 4; celui qui a survécu a résisté ensuite à de nombreuses inoculations d'épreuve. D'un autre côté, les cobayes et les pigeons traités par les méthodes les plus différentes par le virus cholérique meurent par le *Vibrio Metchnikovi* dans la limite de 24 heures. Il est donc à croire qu'il n'existe pas de relations intimes entre les propriétés biologiques de ces deux microbes, très rapprochés pourtant par toute une série de caractères extérieurs.

M.-W. H.

INSTITUT PASTEUR

Personnes traitées mortes de la rage.

TAVEAU (Alice), 7 ans, de Paris. — Mordue le 22 novembre 1889, au mollet droit, qui porte une blessure pénétrante sur la face externe, au niveau du $\frac{1}{3}$ inférieur. Cette morsure a saigné, elle a été lavée aussitôt à la teinture d'arnica. La jambe était recouverte d'un bas qui a été déchiré. Le chien mordeur a été tué et le cadavre a été jeté sans que l'autopsie ait été faite.

L'enfant Taveau a été traitée du 24 novembre au 8 décembre.

Elle a ressenti, à diverses reprises, des douleurs dans la jambe mordue pendant les trois semaines qui ont précédé l'apparition de la rage. Le 31 janvier 1890, l'enfant boite de la jambe droite; le 2 février, le membre paraît un peu gonflé et est douloureux au toucher; le 5 février, l'hydrophobie apparaît, et l'enfant succombe à la rage convulsive le 9 février 1890.

INSTITUT PASTEUR

STATISTIQUE ¹ DU TRAITEMENT PRÉVENTIF DE LA RAGE. — JANVIER 1890.

	A		B		C	
Morsures à la tête { simples.....	»	»	»	2	»	»
et à la figure { multiples....	»	4	»	3	»	1
Cautérisations efficaces.....	»	»	»	»	»	»
— inefficaces.....	2	»	2	»	»	»
Pas de cautérisation.....	2	»	3	»	4	»
Morsures aux mains { simples.....	»	11	»	12	»	2
multiples....	»	17	»	19	»	2
Cautérisations efficaces.....	»	»	2	»	»	»
— inefficaces.....	14	»	10	»	2	»
Pas de cautérisation.....	14	»	19	»	2	»
Morsures aux mem- { simples.....	»	3	»	6	»	2
bres et au tronc { multiples....	»	5	»	12	»	3
Cautérisations efficaces.....	2	»	1	»	»	»
— inefficaces.....	2	»	6	»	1	»
Pas de cautérisation.....	4	»	11	»	4	»
Habits déchirés.....	7	»	16	»	5	»
Morsures à nu.....	1	»	2	»	»	»
Morsures multiples en divers points du corps.....	»	3	»	4	»	»
Cautérisations efficaces.....	»	»	1	»	»	»
— inefficaces.....	»	»	1	»	»	»
Pas de cautérisation.....	3	»	2	»	»	»
Habits déchirés.....	2	»	4	»	»	»
Morsures à nu.....	3	»	4	»	»	»
Totaux. { Français et Algériens ..	29	43	37	58	8	10
Etrangers ..	14	14	21	21	2	2
	A		B		C	
TOTAL GÉNÉRAL.....	111					

1. La colonne A comprend les personnes mordues par des animaux dont la rage est reconnue expérimentalement; la colonne B celles mordues par des animaux reconnus enragés à l'examen vétérinaire; la colonne C les personnes mordues par des animaux suspects de rage.

Les animaux mordeurs ont été : chiens, 96 fois; chats, 10 fois; chacal 2 fois; veau, 2 fois. Dans un cas, la morsure a été faite par un homme atteint de la rage.

Le Gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie Charaire et fils.